

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Philipps-Universität Marburg

Abteilung für Hämatologie, Onkologie und Immunologie

Leiter: Prof. Dr. A. Neubauer

Arbeitsgruppe: Prof. Dr. M. Schuermann

**Chemo- und Radioresistenzverhalten
kleinzelliger Bronchialkarzinomzelllinien
in Adhärenz- und Suspensionskultur**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Sven-Oliver Bachmann

aus Pinneberg

Marburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin

der Philipps-Universität Marburg am 14.07.2005

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch

Referent: Prof. Dr. Marcus Schuermann

Koreferent: Prof. Dr. T. Behr

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Einleitung..... | 3 |
| 1.1. Die therapeutische Herausforderung des kleinzelligen Bronchialkarzinoms | 3 |
| 1.1.1. Die Klassifikation des Bronchialkarzinoms | 4 |
| 1.1.2. Neuroendokrine Differenzierung des kleinzelligen Bronchialkarzinoms | 5 |
| 1.1.3. Das variante kleinzellige Bronchialkarzinom (v-SCLC) | 6 |
| 1.1.3.1. Das variante kleinzellige Bronchialkarzinom auf histologisch/klinischer Ebene | 6 |
| 1.1.3.2. Das variante kleinzellige Bronchialkarzinom auf Zellkulturebene | 7 |
| 1.2. Chemo-/Radiotherapie | 8 |
| 1.2.1. Die Behandlungsstrategie beim kleinzelligen Bronchialkarzinom | 8 |
| 1.2.2. Wirkmechanismen der Chemo-/Radiotherapie | 9 |
| 1.3. Apoptose | 9 |
| 1.4. Chemo-/Radioresistenz | 12 |
| 1.4.1. Chemo-/Radioresistenz durch Apoptoseinhibition | 13 |
| 1.4.1.1. Der Proteinkinase B/Akt-Signalübertragungsweg | 14 |
| 1.4.1.1.1. Die Rolle von PKB/AKT in der Apoptoseinhibition und dem zellulären Überleben | 15 |
| 1.4.1.1.2. PKB/Akt in Zellzyklusprogression und weiteren Funktionen | 17 |
| 1.4.1.2. Adhärenz-vermittelte Chemo-/Radioresistenz | 18 |
| 1.4.2. Multi drug resistance (MDR) | 19 |
| 1.5. Aufgabenstellung | 20 |
| 2. Material und Methoden | 21 |
| 2.1. Material | 21 |
| 2.1.1. Geräte | 21 |
| 2.1.2. Zelllinien | 21 |
| 2.1.3. Zellkulturmaterial | 21 |
| 2.1.4. Chemikalien | 22 |
| 2.1.5. Lösungen und Puffer | 23 |
| 2.1.6. Kits und sonstiges | 23 |
| 2.2. Methoden | 23 |
| 2.2.1. Zellkultur | 23 |
| 2.2.1.1. Kultivierung adhärenter Subklone von Suspensionszelllinien | 23 |
| 2.2.1.2. Kultivierung der Zelllinien | 25 |
| 2.2.1.3. Kultivierung der adhärenenten Zellen auf unbeschichteten Bakterienkulturschalen | 26 |
| 2.2.2. Bestrahlung der Zelllinien | 26 |
| 2.2.3. Proliferationsassays | 26 |
| 2.2.3.1. Proliferationsassays nach Bestrahlung | 26 |
| 2.2.3.2. Proliferationsassays zur Ermittlung der Resistenz gegen Zytostatika | 27 |
| 2.2.4. Apoptoseassays | 27 |
| 2.2.4.1. Hoechst 33342/Propidiumiodid-Färbung | 27 |
| 2.2.4.2. Caspase-3-Assay | 28 |
| 2.2.5. Proteinkinase B/Akt-Antisense-Oligonukleotide | 29 |
| 2.2.6. Durchflußzytometrische Zellzyklusanalyse | 30 |
| 2.2.7. DNA-Extraktion aus Zelllinien | 31 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.2.8. Polymerasekettenreaktion (PCR) | 32 |
| 2.2.8.1. PCR-Amplifikation von Mikrosatelliten | 32 |
| 3. Ergebnisse..... | 34 |
| 3.1. Kultivierung adhärenter Subklone | 34 |
| 3.2. Die Zelllinien H69sus und H69ad sind genetisch identisch | 36 |
| 3.3. Die Genexpression der Zelllinien | 38 |
| 3.4. Das Chemoresistenzverhalten der Zelllinien | 40 |
| 3.4.1. Etoposid (VP16) | 41 |
| 3.4.2. Cyclophosphamid | 42 |
| 3.4.3. Doxorubicin (Adriamycin) | 43 |
| 3.4.4. Paclitaxel (Taxol) | 44 |
| 3.4.5. Zusammenfassung der Chemoresistenz-Ergebnisse | 45 |
| 3.5. Das Radioresistenzverhalten der Zelllinien | 46 |
| 3.6. Gamma-Strahlen induzierte Apoptoseinduktion..... | 49 |
| 3.6.1. Hoechst 33342/ Propidiumiodid-Färbung | 49 |
| 3.6.2. Caspase-3-Assay | 52 |
| 3.7. PKB/Akt-Western-Blots..... | 53 |
| 3.8. PKB/Akt-Antisense-Oligonukleotide | 55 |
| 3.9. Zellzyklusanalyse..... | 58 |
| 4. Diskussion | 61 |
| 4.1 Einordnung der Ergebnisse der Versuche zur Chemo-/Radioresistenz und zur Apoptoseinduktion durch Gamma-Strahlung | 62 |
| 4.1.1 Die Zelllinien bei Zytostatika-Exposition | 62 |
| 4.1.2 Die Zelllinien bei Gamma-Strahlen-Exposition | 63 |
| 4.1.3 Apoptoseinduktion in den Zelllinien durch Gamma-Strahlung | 64 |
| 4.2 Die adhärenten Subklone N592ad und H69ad entsprechen einer varianten kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinie | 64 |
| 4.3 Adhärenz vermittelte Chemo-/Radioresistenz (CAM-DR) verläuft über eine Inhibition der Apoptose | 67 |
| 4.4 Chemo-/Radioresistenz in den adhärenten Subklonen H69ad und N592ad korreliert mit konstitutiv aktivierter Proteinkinase B/Akt | 69 |
| 4.4.1 Einordnung der Ergebnisse der PKB/Akt-Antisense-Oligonukleotid Versuche | 71 |
| 4.5 Zukunftsaussichten | 72 |
| 5. Zusammenfassung | 74 |
| 6. Literaturverzeichnis | 76 |
| 7. Abkürzungen | 90 |
| 8. Anhang..... | 91 |
| 8.1. Verzeichnis der akademischen Lehrer | 91 |
| 8.2. Lebenslauf..... | 92 |
| 8.3. Ehrenwörtliche Erklärung | 93 |
| 8.4. Danksagung..... | 94 |

1. Einleitung

1.1. Die therapeutische Herausforderung des kleinzelligen Bronchialkarzinoms

Das kleinzellige Bronchialkarzinom (englisch: *small cell lung cancer* (SCLC)) ist die bösartigste Form des Lungenkrebses. In Deutschland sterben jedes Jahr circa 8000 Menschen an den Folgen dieser Erkrankung. Nach Diagnosestellung bleibt dem Patienten statistisch gesehen eine Überlebenszeit von 6-12 Monaten (Ettinger 2001). Risikofaktor Nummer eins für die Entstehung eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms ist das Zigarettenrauchen, welches für über 90% aller Fälle verantwortlich gemacht wird (Wingo et al. 1999). Eine Besonderheit des kleinzelligen Bronchialkarzinoms ist seine Eigenschaft, bereits äußerst früh im Krankheitsverlauf Metastasen auszubilden. Da dies in den meisten Fällen bei Diagnosestellung bereits geschehen ist, besteht die Standardtherapie nicht in einer chirurgischen Resektion, sondern in einer Polychemotherapie, eventuell ergänzt durch eine Bestrahlung mit Gamma-Strahlen (Adjei et al. 1999). Diese Therapiestrategie basiert auf einer primär sehr guten Sensitivität des kleinzelligen Bronchialkarzinoms gegenüber Zytostatika und Strahlung, so daß in 60%-100% der Fälle eine Remission des Tumors erreicht wird, die in 15%-40% komplett ist (Paesmans et al. 2000).

Leider jedoch ist dieser therapeutische Erfolg in der Regel nur kurzzeitig. In den meisten Fällen kommt es zum Wiederauftreten des Tumors, diesmal allerdings präsentiert er sich mit einer erworbenen, also sekundären, Resistenz gegen Zytostatika und Gamma-Strahlung. Die mittlere Überlebenszeit des Patienten bei Auftreten des Rezidivs ist noch 4 Monate. Trotz der vielen Fortschritte der Onkologie in den letzten Jahren läßt sich diese sekundäre Chemo- und Radioresistenz kaum überwinden.

Um neue, bessere Therapiestrategien zu entwickeln, müssen zunächst die Mechanismen dieser sekundären Chemo-/Radioresistenz besser verstanden werden. Die Entwicklung und Charakterisierung neuer, Zellkultur-basierter Modelle dient dazu, unser jetziges Verständnis über die Chemo-/Radioresistenz zu erweitern. Dies könnte zur Identifizierung von zentralen Strukturen der Resistenzbildung führen, die als Angriffspunkt für neu zu entwickelnde, effektivere Pharmaka dienen könnten.

1.1.1. Die Klassifikation des Bronchialkarzinoms

Der Begriff Lungenkrebs wird für Tumore verwendet, die vom Epithel des Respirationstraktes, also aus Bronchien, Bronchiolen oder Alveolen stammen. Eingeteilt wird das Bronchialkarzinom nach einer Klassifikation der World Health Organization (WHO), welche in Tabelle 2.1 dargestellt ist (WHO 1982 und Travis et al. 1999). Die einzelnen dargestellten Formen des histologischen Typs werden meist noch weiter in Subtypen unterteilt.

| Histologischer Typ | Häufigkeit | 5-Jahres-Überlebensrate |
|----------------------------------------------------------------------------------------|------------|-------------------------|
| Adenokarzinom <i>adenocarcinoma</i> (ADC) (inklusive bronchoalveolärem Karzinom) | 35% | 17 % |
| Plattenepithelkarzinom <i>squamous cell carcinoma</i> (SCC) | 29% | 15% |
| großzelliges Karzinom <i>large cell carcinoma</i> (LCC) | 9% | 11 % |
| kleinzelliges Bronchialkarzinom <i>small cell carcinoma</i> (SCLC) | 18% | 5 % |
| Karzinoid <i>carcinoid</i> | 1% | 83 % |
| andere/nicht klassifizierte | 8% | |

Tab. 1-1: Häufigkeit und 5-jahres-Überlebensrate der verschiedenen epithelialen invasiven malignen Tumore der Lunge (beide Geschlechter und alle Stadien gemittelt) (nach Travis et al. 1996).

Wichtig ist die Unterscheidung zwischen dem kleinzelligen Bronchialkarzinom (SCLC) und den anderen Entitäten, die als nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom (NSCLC) (also Adenokarzinom, Plattenepithelkarzinom und großzelliges Karzinom) zusammengefaßt werden. Diese Unterscheidung spiegelt unterschiedliche biologische und klinische Eigenschaften der Tumore wieder, so daß eine genaue Untersuchung des histologischen Ausgangsmaterials der erste Schritt zur richtigen Therapiestrategie ist. Das kleinzellige Bronchialkarzinom metastasiert früh und wird mit einer Polychemotherapie, gründend auf der primär guten Sensitivität hierfür, behandelt. Im Gegensatz dazu ist das nichtkleinzellige Bronchialkarzinom primär wesentlich resistenter gegenüber der Polychemotherapie und der Strahlentherapie. Es ist dafür mit besserem Erfolg chirurgisch kurativ resektabel als das

kleinzellige Bronchialkarzinom (Minna 2002). Letzteres hat die deutlich schlechtere Prognose, nicht zuletzt auf Grund des Auftretens sekundär resistenter Rezidive. Tab. 1-2 faßt die wichtigsten Unterschiede zusammen.

| Kleinzelliges Bronchialkarzinom (SCLC) | | Nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom (NSCLC) |
|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| Teilremission: 90% komplette Remission: 30% | Antwort auf Polychemotherapie | Teilremission: ca. 40-60% komplette Remission: 5% |
| Schrumpfung in 80-90% öfters komplette Remission | Antwort auf Radiatio | Schrumpfung in ca. 30-50% selten komplette Remission |
| in der Regel ja | Ausprägung neuroendokriner Marker (siehe 2.1.2) | in der Regel nein |
| in der Regel ja | Peptidhormonproduktion (siehe 2.1.2) | in der Regel nein |
| sehr hoch | Metastasierungspotential | mittelhoch |
| primär Polychemo-/Radiotherapie | Therapie | wenn möglich primär chirurgisch |

Tab. 1-2: Einige wichtige Unterschiede zwischen dem kleinzelligen und dem nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom (Minna 2002)

1.1.2. Neuroendokrine Differenzierung des kleinzelligen Bronchialkarzinoms

Das kleinzellige Bronchialkarzinom gehört zu den sogenannten neuroendokrinen Tumoren. Eine neuroendokrine Zelle zeichnet sich durch die Expression bestimmter Marker-Moleküle aus, sie ist auf eine bestimmte Art und Weise differenziert (Pearse 1969). Zu den klassischen, am längsten bekannten Merkmalen einer neuroendokrinen SCLC-Zelle gehört u. a. die Expression von L-Dopa-Decarboxylase, Gastrin releasing peptide (GRP, auch Bombesin), Chromogranin A, Synaptophysin, Neuronspezifischer Enolase (NSE), dem neuronalen Zelladhäsionsmolekül (NCAM) und vielen weiteren (Gazdar et al. 1980; Carney et al. 1985; Gazdar et al. 1988; Carbone et al. 1991). Neuroendokrine Zellen gibt es in geringer Zahl in vielen verschiedenen Geweben; sie sind in ihrer Differenzierung neuralem Gewebe ähnlich. Ihre primäre Funktion ist es, Hormone und bioaktive Peptide zu produzieren, verpacken und zu sezernieren (Carbone 1997). Die Speicherorte, sogenannte "dense core granules", lassen sich auf elektronenmikroskopischer Ebene nachweisen. Zu diesen Peptiden zählen in erster Linie GRP, Calcitonin, Neurotensin, Cholecystokinin, Vasopressin und Corticotrophin, aber auch Insulin, Somatostatin, Glucagon, Gastrin und

Substanz P (Carbone 1997). Für viele dieser Substanzen konnte gezeigt werden, daß sie *in vitro* die Proliferation von kleinzelligen Bronchialkarzinom-Zellen beschleunigen, was autokrine Stimulationswege möglich macht (Sethi und Rozengurt 1991). Auch in der normalen Bronchialschleimhaut gibt es neuroendokrine Zellen, die einzeln in der Mukosa liegen oder sogenannte NEBs (*neuroepithelial bodys*) bilden. Als ein für die Entwicklung dieser NEBs essentieller Transkriptionsfaktor wurde das *human achaete-scute homologue-1* (hASH1) identifiziert (Borges et al. 1997). Von Mitgliedern der *achaete-scute* Familie von Transkriptionsfaktoren ist bekannt, daß sie in der Taufliege *Drosophila* eine kritische Rolle bei der Entwicklung und Differenzierung von Neuronen spielen. Bei der Untersuchung von Bronchialkarzinomzelllinien zeigt sich, daß hASH1 ausschließlich in als neuroendokrin geltenden Zelllinien exprimiert wird, also in den neuroendokrin differenzierten klassischen kleinzelligen Bronchialkarzinom-Linien.

1.1.3. Das variante kleinzellige Bronchialkarzinom (v-SCLC)

Man muß nach der Klassifikation der WHO von 1999 das sogenannte kombinierte oder variante kleinzellige Bronchialkarzinom (v-SCLC) vom normalen kleinzelligen Bronchialkarzinom unterscheiden (Travis et al. 1999). Zur besseren Übersichtlichkeit wird im folgenden vom varianten kleinzelligen Bronchialkarzinom (v-SCLC) und vom klassischen (normalen) kleinzelligen Bronchialkarzinom (c-SCLC) gesprochen. Um Konfusionen zu vermeiden, muß man wissen, daß das variante SCLC sowohl auf histologisch/klinischer Ebene, als auch auf der Ebene der Kultivierung von SCLC-Zelllinien definiert wurde.

1.1.3.1. Das variante kleinzellige Bronchialkarzinom auf histologisch/klinischer Ebene

Beim v-SCLC handelt es sich histologisch gesehen um einen kleinzelligen Tumor, der nicht ausschließlich kleine, SCLC-artige Zellen aufweist, sondern auch Abschnitte mit großzelligen Anteilen besitzt (Abeloff et al. 1979). Diese können plattenepithelartig, drüsig oder auch großzellig undifferenziert sein. Auf Grund dieser gemischten Histologie leitet sich der Begriff kombiniertes kleinzelliges Bronchialkarzinom ab. Die Prognose für Patienten mit einem v-SCLC ist dabei nochmals signifikant schlechter als die bei einem Patienten mit einem c-SCLC (Radice et al. 1982; Hirsch et al. 1983; Sehested et al. 1986; Aisner et al. 1990; Fushimi et al. 1992). Radice et al. (1982) geben die mittlere Überlebenszeit nach Diagnosestellung für Patienten mit einem varianten SCLC mit circa 6

Monaten an, die für Patienten mit einem klassischen SCLC mit 10,5 Monaten. Die Rate der partiellen und kompletten Remissionen auf die Chemo-/Strahlentherapie ist bei v-SCLC Patienten wesentlich geringer. Nur bei 16% der v-SCLC-Patienten im Gegensatz zu 46% bei c-SCLC-Patienten stellt sich eine komplette Remission ein und eine partielle Remission erreichen nur 58% der v-SCLC Patienten im Vergleich zu 91% der c-SCLC-Patienten. Das v-SCLC ist also wesentlich chemo-/strahlenresistenter. Fushimi et al. (1996) zeigen, daß in ihrem Patientengut im Primärtumor bei Diagnose in 8,6% der Fälle ein v-SCLC festgestellt wird, während es bei Autopsie 14,6% der Fälle sind. Für Metastasen können sie zeigen, daß sich auch in Fällen mit einem klassisch aufgebautem kleinzelligem Primärtumor Metastasen mit einem histologisch varianten Charakter einstellen können, signifikant häufiger in Fernmetastasen (Hirn (66,7%), Leber (36,4%), Nebenniere (26,8%) und extrathorakale Lymphknoten (28,8%)) als in Metastasen der Lunge, Pleura und intrathorakalen Lymphknoten (10-12%). Brambilla et al. (1991) verglichen die Histologie von 20 Patienten mit einem reinen c-SCLC vor Therapiebeginn mit der Histologie der selben Patienten bei Auftreten von chemoresistenten Rezidiven. Sie fanden in 10 von 20 Fällen in den chemoresistenten Rezidivtumoren eine kleinzellige Histologie mit großzelligen, glandulären oder plattenepithelartigen Bereichen, also v-SCLCs.

Diese Daten zeigen, daß ein c-SCLC im Krankheitsverlauf unter dem Einfluß von Chemo-/Radiotherapie oder spontan seine Biologie ändern kann und sich in ein v-SCLC umdifferenzieren kann, was mit einer Resistenz gegen Chemo-/Radiotherapie einhergeht und eine noch schlechtere Prognose hat.

1.1.3.2. Das variante kleinzellige Bronchialkarzinom auf Zellkulturebene

Unabhängig von klinisch/histologischen Befunden sind auch auf der Ebene der Kultivierung von SCLC-Zellen morphologisch variante Zellkulturen beschrieben worden. Gazdar et al. (1985) und Carney et al. (1985) zeigten, daß in an Explantaten etablierten SCLC-Zellkulturen circa 70% der Linien vom morphologischen und biochemischen Aspekt typische SCLC-artige Eigenschaften besitzen. Dies drückt sich aus als Wachstum von kleinen, kugeligen Zellen, die dichtgepackt in Aggregaten von vielen hundert Zellen im Medium schwimmen und neuroendokrine Marker wie L-Dopa-Decarboxylase oder Gastrin releasing peptide exprimieren. Bei 30% der Zelllinien fanden sie dagegen ein "variantes" Muster: Diese Linien zeigen morphologische Abweichungen. Sie wachsen adhärent am Zellkulturflaschenboden oder in nur noch losen Aneinanderreihungen im Medium und sie

besitzen keine Expression neuroendokriner Markermoleküle. Bei Bestrahlungsversuchen mit Gamma-Strahlen zeigen diese varianten Linien erhöhte Resistenzen (Carney et al. 1983; Morstyn et al. 1984), die Proliferationsgeschwindigkeit sowie die Effizienz zur Kolonieformung ist höher. In diesen Zellen findet sich häufig das Onkogen c-myc amplifiziert (Little et al. 1983). In einem Xenograft-Modell der Maus zur Untersuchung des Metastasierungspotentials konnte gezeigt werden, daß variante Zelllinien signifikant stärker metastasieren als klassische Zelllinien (Shtivelman und Namikava 1995). Shtivelmann (1997) zeigte ebenfalls am Beispiel von zwei varianten SCLC-Zelllinien, daß diese resistent gegen Zytostatika-induzierte Apoptose sind, was nach ihrer Meinung auf den Verlust des Metastasis-Suppressor-Gens CC3 zurückzuführen sei.

Variante SCLC können somit sowohl als histologisch-klinisches Phänomen, als auch auf Zellkulturebene definiert werden. Gazdar et al. (1985) verknüpften die beiden Aspekte, indem sie zeigen, daß 5 der 10 selbstetablierten varianten SCLC-Zelllinien nicht nur *in vitro* variante Eigenschaften besitzen, sondern daß auch beim Spenderpatienten, von dem die Zelllinie generiert wurde, histologisch ein v-SCLC vorlag. Injizieren Sie diese varianten Zelllinien in immundefiziente Nacktmäuse, bilden sich ebenfalls variante, also histologisch vom klassischen SCLC abweichende Tumore.

1.2. Chemo-/Radiotherapie

1.2.1. Die Behandlungsstrategie beim kleinzelligen Bronchialkarzinom

Die Standardbehandlung des kleinzelligen Bronchialkarzinom-Patienten ist die Polychemotherapie. Sie verlängert die mittlere Überlebensrate bei Patienten im Stadium *limited disease* (der Tumor einschließlich befallener Lymphknoten ist auf einen Hemithorax beschränkt) auf 14 bis 20 Monate, bei Patienten im Stadium *extensive disease* (der Tumor überschreitet oben genannte Grenzen) auf 8 bis 13 Monate (Seifter et al. 1988). Bei Patienten im Stadium *limited disease* wird die Polychemotherapie mit einer Bestrahlung des Thorax mit Gamma-Strahlen kombiniert. Eine übliche Gesamtdosis ist hierbei 50-60 Gy, fraktioniert in tägliche Einzeldosen zu 1,8-2,0 Gy. Bei kompletter Remission kann eine prophylaktische kraniale Bestrahlung angeschlossen werden. Die Polychemotherapie wird nach verschiedenen Protokollen durchgeführt. Diese beinhalten z.B. die Kombination von Cyclophosphamid/Doxorubicin/Etoposid (CAE), Cyclophosphamid/Doxorubicin/Vincristin (CAV), Cyclophosphamid/Doxorubicin/Vincristin/Etoposid (CAVE) oder

Cisplatin/Etoposid (PE) (Adjei et al. 1999). Teilremissionen werden bei Patienten im Stadium *limited disease* so in 80-100% der Fälle, bei *extensive disease* in 60-80% beobachtet; komplette Remissionen werden zu 50-70% im Stadium *limited disease* und zu 15-40% bei *extensive disease* erreicht (Paesmans et al. 2000). Die Remissionen sind meist kurz, im Mittel 6-8 Monate; die mittlere Überlebenszeit bei Auftreten des Rezidivs ist 4 Monate. Ansätze, die Therapie zu verbessern, bestehen zum Beispiel in der Anwendung von neueren Medikamenten wie den Taxanen (Paclitaxel, Docetaxel) und den Topomerase I-Inhibitoren (Topotecan, Irinotecan) oder der Intensivierung der Therapie bishin zu myeloablativen Dosen mit konsekutiver Stammzelltransplantation (Humblet et al. 1987).

1.2.2. Wirkmechanismen der Chemo-/Radiotherapie

In vitro Untersuchungen an malignen Zelllinien haben nachgewiesen, daß alle Zytostatika den Zelltod über eine Induktion des Apoptoseprogramms herbeiführen können (Mesner et al. 1997). Daß der Apoptoseprozeß auch *in vivo* eine wichtige Rolle in der Wirkung der Chemotherapeutika spielt, zeigen zum Beispiel Untersuchungen an Leukämie-Patienten, die nach Induktionschemotherapie eine deutlich erhöhte Anzahl an apoptotischen Blasten aufweisen (Li et al. 1994). Der Apoptoseprozeß scheint also der Hauptmechanismus zu sein, über den die Zytostatika ihre Wirkung auf die Tumorzellen entfalten (Kaufmann und Earnshaw 2000); andere Prozesse wie verspätete Apoptose und Nekrose spielen auch eine Rolle, deren Stellenwert noch genauer zu determinieren ist (Houghton 1999). Ähnliches gilt für die Antwort maligner Zellen auf ionisierende Strahlung, insbesondere Gamma-Strahlung. Die Herbeiführung von Apoptose ist auch hier von zentraler Bedeutung (Zhivotovsky et al. 1999; Abend und van Beuningen 1997), die Anteile des Zelltodes in der Mitosephase und der Apoptose zum Gesamtbeitrag des Zelltodes sind jedoch nicht endgültig geklärt (Hendry und West 1997).

1.3. Apoptose

Wie oben ersichtlich ist, ist die Apoptose der zentrale Mechanismus, über den Zytostatika und Gamma-Strahlen ihre Wirkung entfalten. Wie funktioniert nun Apoptose?

Apoptose ist ein genetisch fixierter, morphologisch und biochemisch definierter Prozeß, der eine Art geregelten physiologischen Zelluntergang darstellt, manchmal zur besseren Verständlichkeit auch als "zellulärer Selbstmord" bezeichnet, zuerst beschrieben in Kerr et

al. (1972). Die apoptotische Zelle zerstört sich selbst, ohne Nachbarzellen zu schädigen oder eine Entzündungsreaktion hervorzurufen und dient damit der Integrität des Gesamtorganismus. Morphologisch ist die Apoptose definiert durch eine blasige Veränderung der Plasma und Kernmembran (*blebbing*), Schrumpfung der Zelle sowie Fragmentierung und Kondensierung des Chromatins (Wyllie et al. 1980). Die Ausführung des Apoptoseprogramms übernimmt eine Familie von Enzymen, die sogenannten Caspasen, die in der Evolution hoch konserviert ist und durch Studien an der Nematode *C. elegans* entdeckt wurde (Ellis et al. 1991). Verschiedene Signalwege, die Apoptose auslösen, münden in einer Aktivierung der Caspasen. Einmal aktiviert, spalten sie eine Vielzahl intrazellulärer Polypeptide, einschließlich der Strukturproteine des Nukleus und des Zytoplasmas, der Proteine des DNA-Reparaturmechanismus und diverser Proteinkinasen und lösen so den typischen Apoptoseprozeß in der Zelle aus (Earnshaw et al. 1999). Caspasen zeichnen sich durch ihre Substratspezifität aus: Es sind Cystein-Proteasen, die die Polypeptide spezifisch an einem Aspartat spalten. Heutzutage kennt man mindestens 12 Caspasen, von denen sechs definitiv in den Prozeß der Apoptose involviert sind (Caspase-3, -6, -7, -8, -9 und -10). Caspase-8 und -9 sind die sogenannten Initiator-Caspasen, da sie die ersten Caspasen sind, die aktiviert werden und konsekutiv die anderen Caspasen, die sogenannten Effektor-Caspasen, aktivieren (Earnshaw et al. 1999). Man unterscheidet zwei verschiedene Hauptsignalwege, die zur Aktivierung von Caspasen führen (Budihardjo et al. 1999). Der eine geht über sogenannte Todes-Rezeptoren (*death-receptors*), von denen der am besten charakterisierte Fas ist. Bindet Fas-Ligand (FasL) an den Rezeptor kommt es zu einer Trimerisierung des Rezeptors und zur Anlagerung der *Fas associated death domain* (FADD), die dann Procaspase-8 aktiviert (Siegel et al. 1998). Zu diesen Todes-Rezeptoren zählt neben Fas auch der Rezeptor des Tumor-Nekrose-Faktors α (TNFR1), sowie *death receptor 3* (DR3), DR4, DR5 und DR6 (Ashkenazi et Dixu 1999).

Der andere Weg, mitochondrialer Weg genannt, führt über die Freisetzung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium. Cytochrom C bindet an Apaf-1 (*Apoptotic protease activating factor 1*), dessen Konformationsänderung daraufhin eine Aktivierung von Procaspase-9 ermöglicht (Li et al. 1997). Reguliert wird die Freisetzung von Cytochrom C durch die Bcl-2 Familie. Proapoptotische Mitglieder der Familie, Bax und Bak, sind in der äußeren Membran des Mitochondriums lokalisiert und können eine Cytochrom C Freisetzung über einen spannungsabhängigen Ionenkanal bewirken (Shimizu et al. 1999; Desagher et al. 1999, Griffiths et al. 1999).

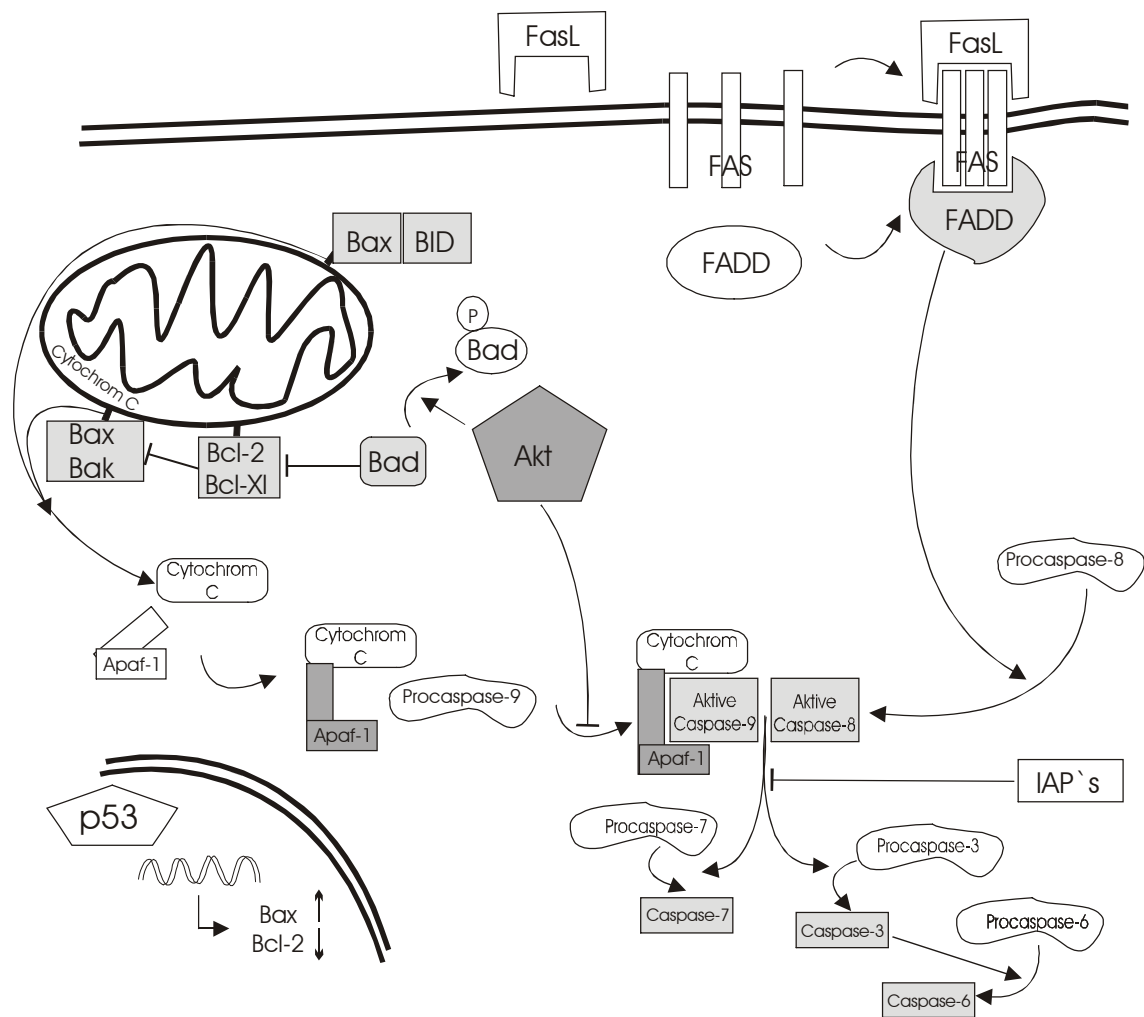


Abb. 1-1: Signalwege, die zum Zelltod führen: Die Apoptosesignalwege. Erläuterungen siehe Text.

Reguliert wird die Bcl-2 Familie über die Expression anti-apoptotischer Mitglieder wie Bcl-2 und Bcl-XL, die die Funktion von Bax und Bak antagonisieren (Gross et al. 1999). Das Tumorsupressorgen p53 nimmt Einfluß durch transkriptionelle Hochregulierung von Bax und Herunterregulierung von Bcl-XL und Bcl-2 (Miyashita und Reed 1995). Das proapoptotische Protein Bad, welches wiederum Bcl-2 und Bcl-XL hemmt (Yang et al. 1995), kann durch die Proteinkinase A, die Proteinkinase B/Akt und ERK (eine *mitogen activated protein kinase* (MAPK)) phosphoryliert und damit inaktiviert werden (Cross et al. 2000).

PKB/Akt reguliert auf vielen weiteren Ebenen (siehe auch Kapitel 1.4.1.1) Apoptose: Es kann zum Beispiel die Aktivität der Caspase-9 und der Caspase-3 inhibieren (Zhou et al. 2000) und Einfluß auf die Freisetzung des Transkriptionsfaktors NF- κ B nehmen, unter dessen Kontrolle einige Gene der sogenannten *inhibitor of apoptosis proteins* (IAP's)

stehen. cIAP1 und cIAP2 zum Beispiel können direkt Caspase-8 und Caspase-9 hemmen (Deveraux et al. 1999).

Es gibt auch Verbindungen zwischen den beiden beschriebenen Hauptwegen. So wird in einigen Zellen durch über einen Todes-Rezeptor aktivierte Caspase-8 ein Mitglied der Bcl-2-Familie, BID, aktiviert. Aktiviertes BID kann mit Bax am Mitochondrium positiv die Freisetzung von Cytochrom C beeinflussen (Desagher et al. 1999) und stellt so eine Verbindung zwischen Todes-Rezeptor und Mitochondrium her.

Im Rahmen von Stressreaktionen, verursacht durch z. B. ionisierende Strahlung, Hitzeschock oder osmotischen Stress, wird JNK, zur Familie der MAPKinasen gehörig und auch als *stress activated protein kinase* (SAPK) bezeichnet, aktiviert. Dies erzeugt ein pro-apoptotisches Signal über die Freisetzung von Cytochrom C (Davis 2000).

Chemotherapeutika üben einen Großteil ihrer Wirkung durch Apoptoseinduktion aus. Obwohl es auch zahlreiche Berichte über eine chemotherapeutikainduzierte Hochregulierung des Fasliganden und Rezeptor gibt (z.B. in Friesen et al. 1996), scheint der mitochondriale Signalweg die vorherrschende Rolle der chemotherapeutikainduzierten Apoptose zu spielen (Kaufmann und Earnshaw 2000). So sind zum Beispiel FADD^{-/-} Maus-Fibroblasten resistent gegen Fas, TNFR1 und DR3 vermittelte Apoptose, nicht aber gegen Doxorubicin (Yeh et al. 1998). Caspase-9^{-/-} Fibroblasten sind dagegen sensitiv für Fas und TNFR1 vermittelte Apoptose, aber resistent gegen Etoposid und Gamma-Strahlung (Hakem et al. 1998).

1.4. Chemo-/Radioresistenz

Bei allen Neoplasien, die nicht einer vollständigen chirurgischen Therapie zugänglich sind, stellt die Chemo-/Radiotherapie heutzutage die wichtigste Therapieoption dar. Dementsprechend stellt ein Versagen dieser Therapie, ausgedrückt durch eine Resistenz der malignen Zellen gegen die angewandten Mittel, ein Hauptproblem dar. Man unterscheidet die primäre Resistenz, bei der eine Neoplasie schon zu Therapiebeginn resistent ist, von der sekundären oder erworbenen Resistenz, die der Tumor erst sekundär, also im Verlauf der Krankheit entwickelt, nachdem er zunächst therapiesensibel gewesen war. Dies gilt besonders für das SCLC; wie bereits oben erwähnt, gehört es zu den primär gut auf Chemo-/Radiotherapie ansprechenden Tumoren; es rezidiert jedoch nach partieller oder

kompletter Remission in den allermeisten Fällen als chemo- und strahlentherapieresistenter Tumor.

1.4.1. Chemo-/Radioresistenz durch Apoptoseinhibition

Chemotherapeutika und Gamma-Strahlen üben einen Großteil ihrer Wirkung über den Mechanismus der Apoptoseinduktion aus (siehe Kapitel 1.2.2). Das legt den Gedanken nahe, daß eine Inhibition der Apoptose ein Schlüsselmechanismus der Resistenzentwicklung gegenüber der Chemotherapie oder der Strahlentherapie sein kann. Das Konzept der Resistenzentwicklung auf Grund eines dysfunktionellen oder herabgeregelten Apoptose-Signalweges ist zur Zeit Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen. Es wurden einige Signalwege identifiziert, die in malignen Zellen ein antiapoptotisches Signal übertragen und so eine Resistenz hervorrufen können. Hier einige Beispiele:

Die Proteinkinase B /Akt ist ein potentes anti-apoptotisches Signalübertragungsmolekül. Page et al. (2000) konnten zeigen, daß PKB/Akt überexprimierende Ovarialkarzinomzellen hochresistent gegen Paclitaxel im Vergleich zu niedrig exprimierenden Zellen sind, was mit einem erhöhten Anteil an phosphoryliertem Bad-Protein einhergeht. O’Gorman et al. (2000) konnten die AML-Zelllinie HL60 sensitiv gegenüber Chemotherapeutika machen, indem sie die im Signalweg oberhalb von PKB/Akt gelegene PI_3 -Kinase hemmten.

Dem Transkriptionsfaktor NF- κ B wird ebenfalls eine Rolle in der Chemoresistenz zugeschrieben. Wang et al. (1999) zeigten, daß Nacktmäuse mit resistenten Fibrosarkomen sensitiv für TNF α und CPT-11 (Irinotecan) induzierte Apoptose werden, wenn der NF- κ B Inhibitor I κ b α über Adenoviren in den Tumor gebracht wird.

Unter der Kontrolle von NF- κ B stehen eine Reihe von IAP’s, sogenannte *inhibitors of apoptosis*. Holcik et al. (2000) zeigten, daß in NSCLC-Zelllinien Bestrahlung mit Gamma-Strahlen zu einer Hochregulierung von XIAP führt und mit primärer Bestrahlungsresistenz korreliert.

In den genannten Beispielen steht die Inhibition der Apoptose zumindest teilweise unter dem Einfluß des Proteinkinase B/Akt-Signalweges, was dessen Gewicht in der durch Apoptoseinhibition induzierten Chemo-/Radioresistenz verdeutlicht. Er soll im Folgenden näher erläutert werden.

1.4.1.1. Der Proteinkinase B/Akt-Signalübertragungsweg

Die Proteinkinase B (PKB), auch Akt genannt, ist als Serin-/Threonin-Proteinkinase ein zentrales Protein des Signalübertragungsnetzwerkes der Zelle mit Einfluß auf Apoptose, Proliferation und Glukosemetabolismus. Sie wurde 1991 von drei Gruppen unabhängig voneinander entdeckt (Coffer et Woodgett 1991; Jones et al. 1991; Bellacosa et al. 1991). Heute kennt man drei Mitglieder der PKB/Akt-Familie, PKB α /Akt1, PKB β /Akt2 und PKB γ /Akt3. Sie sind das Produkt unterschiedlicher Gene und in verschiedenen Geweben differentiell exprimiert (Kandel et Hay 1999). Allen Isoformen gemeinsam ist eine N-terminale Pleckstrin-Homologie-Bindungs-Domäne (PH-Domäne), gefolgt von einer katalytischen Untereinheit, gefolgt von einer C-terminalen regulatorischen Domäne mit konservierten Threonin- und Serin-Resten (Thr308 und Ser473 in Akt1), an denen das Protein phosphoryliert und damit aktiviert wird (Kandel et Hay 1999).

PKB/Akt liegt auf einem Signalweg abwärts der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI₃K) (Franke et al. 1995, Burgering et al. 1995). Aktivierte PI₃K phosphoryliert den Membranbestandteil Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PI(4,5)P₂), es entsteht Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PI(3,4,5)P₃) (Vanhaesebroeck und Waterfield 1999). PKB/Akt bindet mit seiner PH-Domäne an dieses Lipid (Klippel et al. 1997), was eine Translokation von PKB/Akt an die Zellmembran bedeutet, wo es von den ebenfalls durch ihre PH-Domänen an PI(3,4,5)P₃ der Membran gebundenen Kinasen PDK1 und PDK2 an den oben genannten Serin- und Threonin-Resten phosphoryliert wird (Vanhaesebroeck et Alessi 2000) (siehe Abb. 1-2). Negativ reguliert wird das Signal durch Dephosphorylierung von PI(3,4,5)P₃ an der 3-OH-Position durch das als Tumorsuppressorgen bekannte PTEN (Stambolic et al. 1998) oder an der 5-OH Position durch SHIP (Liu et al. 1999).

Aktivatoren der PI₃-Kinase und konsekutiv der PKB/Akt sind in erster Linie die große Familie der Rezeptortyrosinkinasen (RTK), welche ein Signal von extrazellulär, zum Beispiel in Form der Bindung eines Wachstumsfaktors, in die Zelle leiten. Zu diesen RTK gehört zum Beispiel der *epidermal growth factor*-Rezeptor (EGF-R), der *vascular endothelial growth factor*-Rezeptor (VEGF-R), der Insulin-Rezeptor, die Rezeptortyrosinkinase Axl und viele weitere (Blume-Jensen et Hunter 2001). Ebenfalls Aktivatoren der PI₃-Kinase sind die Integrine, welche zelluläre Adhäsion an extrazelluläre Matrix vermitteln. Sie aktivieren die Tyrosinkinase *focal adhesion kinase* (FAK), welche

mit der PI₃-Kinase assoziiert (Chen et al. 1994), was zu einer Aktivierung von PI₃K und konsekutiv PKB/Akt führt (King et al. 1997).

Aktiviertes PKB/Akt kann sowohl im Zytoplasma, als auch im Zellkern seine Zielproteine phosphorylieren. Nicht immer ist es derzeit klar, in welchem der Kompartimente die im folgenden beschriebenen Prozesse ablaufen (Nicholson und Anderson 2002). Die Anzahl der bekannten physiologischen Substrate von PKB/Akt nimmt mit der Geschwindigkeit der Entdeckungen zur Zeit rapide zu und wird hier mit Betonung auf für die Onkogenese relevante Prozesse dargestellt.

1.4.1.1.1. Die Rolle von PKB/AKT in der Apoptoseinhibition und dem zellulären Überleben

In Verbindung mit dem Apoptoseprozeß wurde PKB/Akt gebracht, als Dudek et al. (1997) demonstrierten, daß Kleinhirneurone durch IGF-1 über eine PKB/Akt-Aktivierung vor Apoptose geschützt werden. PKB/Akt inhibiert auf mehreren Ebenen den Apoptoseprozeß, schützt die Zelle also vor dem programmierten Zelltod. Es phosphoryliert BAD, ein proapoptotisches Mitglied der Bcl-2-Familie (Datta et al. 1997) und inaktiviert es damit. Phosphoryliertes BAD wiederum bindet an sogenannte 14-3-3 Proteine und kann so letztlich nicht mehr seine Funktion am Mitochondrium wahrnehmen (siehe Kapitel 1.3 und Abb. 1-2).

Ein weiteres Zielprotein ist die *Apoptosis signal-regulating kinase 1* (ASK1), eine *MapKinaseKinaseKinase* (MAPKKK), die via JNK im Rahmen von Stressreaktionen wie ionisierender Strahlung, Hitzeschock oder osmotischem Stress ein pro-apoptotisches Signal übertragen kann (Davis, 2000) (siehe Abb. 1-2 und Kapitel 1.3). PKB/Akt phosphoryliert und inaktiviert ASK-1 und kann so das über die Streß-Signalwege generierte proapoptotische Signal inhibieren (Kim et al. 2001).

Desweiteren inhibiert PKB/AKT die Aktivität von Caspase-9 und Caspase-3 (Zhou et al. 2000).

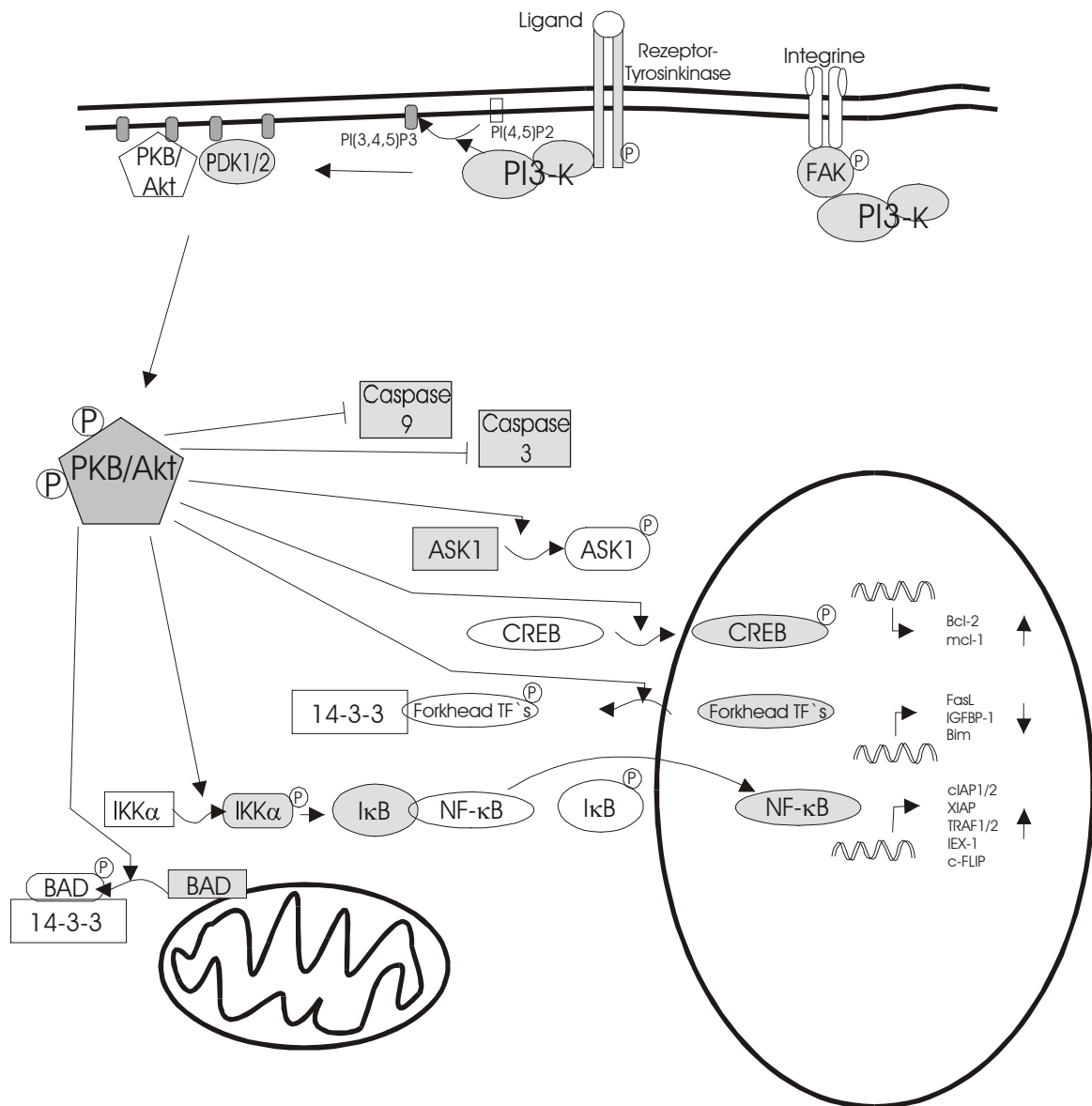


Abb. 1-2: Aktivierung von PKB/Akt und anti-apoptotische Signalübertragung. Aktive Formen der Proteine grau unterlegt

Auf transkriptioneller Ebene nimmt PKB/Akt ebenfalls wichtigen Einfluß. Es kann den Transkriptionsfaktor NF-κB aktivieren, unter dessen Kontrolle unter anderem mehrere anti-apoptotische Gene stehen. NF-κB liegt im Cytoplasma als Komplex mit IκB vor. PKB/Akt phosphoryliert die IκB-Kinase IKKα, die daraufhin IκB phosphoryliert (Ozes et al. 1999; Romashkova et al. 1999), welches degradiert und daraufhin NF-κB freisetzt; dieses wandert in den Nukleus und regt dort die Transkription an. NF-κB regt unter anderem die Transkription der antiapoptotischen Gene TRAF1, TRAF2, cIAP1 und cIAP2 (Wang et al.

1998), IEX-1 (Wu et al. 1998), XIAP (Stehlik et al. 1998) sowie c-FLIP (Micheau et al. 2001) an.

Aus Studien an der Nematode *C.elegans* ist der *forkhead* Transkriptionsfaktor DAF-16 als Ziel von PKB/Akt identifiziert worden. PKB/Akt phosphoryliert seine drei menschlichen Homologe FKHR, FKHL und AFX, welche daraufhin im Zytoplasma verbleiben und nicht ihre Transkriptionsaktivität aufnehmen können (Kops et al. 1999). So wird die Expression proapoptotischer Gene wie FasLigand, IGFBP-1 und Bim, ein Mitglied der Bcl-2 Familie, herunterreguliert (Brunet et al. 1999; Dijkers et al. 2000).

Schließlich ist der Transkriptionsfaktor *cAMP-response element binding protein* (CREB) Ziel einer Phosphorylierung und Aktivierung durch PKB/Akt (Du et Montminy 1998), was eine Expression antiapoptotischer Gene wie Bcl-2 (Pugazhenti et al. 2000) oder mcl-1 (Wang et al. 1999) zur Folge hat.

1.4.1.1.2. PKB/Akt in Zellzyklusprogression und weiteren Funktionen

Hinweise, daß PKB/Akt den Zellzyklus beschleunigt, erhielt man erstmals, als Cheng (1997) in PKB/Akt überexprimierenden murinen Fibroblasten eine Transformation und Zellzyklus-Progression sah. Heute weiß man, daß PKB/Akt vor allem den Übergang von der G1- in die S-Phase positiv reguliert. Dazu gehört die transkriptionelle Hochregulierung von CyclinD1, welches zur Aktivierung der *cyclin dependent kinase 4* (CDK4) benötigt wird. CDK4 inaktiviert das Retinoblastoma protein (pRB) und ermöglicht so einen Übergang von der G1 in die S-Phase. PKB/Akt kann die Hochregulierung von CyclinD1 durch Phosphorylierung und Inaktivierung von GSK-3 erreichen, welches dann nicht mehr b-Catenin phosphoryliert. B-Catenin kann so im Nukleus mit mehreren anderen Faktoren die Hochregulierung von CyclinD1 bewirken (Aberle et al. 1997; Shtutman et al. 1999). Ein anderer Weg zur Hochregulierung von CyclinD1 führt über die Phosphorylierung und Aktivierung von mTOR (Muisse-Helmericks et al. 1998).

P21^{CIP} und p27^{KIP} sind Inhibitoren der CDK4. P21^{CIP} kann direkt von PKB/Akt phosphoryliert werden, was eine zelluläre Translokation vom Nukleus, wo es seine inhibitorische Funktion ausübt, in das Zytoplasma bewirkt (Zhou et al. 2001). Für p27^{KIP} wurde ein ähnlicher Mechanismus beschrieben; außerdem spielen in der komplexen Regulation dieses Proteins die *forkhead* Transkriptionsfaktoren, die zum Teil an der p27^{KIP}-

Genexpression beteiligt sind (Medema et al. 2000) und von PKB/Akt inaktiviert werden (siehe oben), eine Rolle.

Eine aktuelle Arbeit berichtet, wie PKB/Akt das p53 Tumorsuppressorgen beeinflussen kann. P53 wird negativ durch Mdm-2 reguliert, welches zur Ausübung dieser Funktion vom Zytoplasma in den Nukleus wandern muß. Mayo und Donner (2001) zeigen, daß PKB/Akt Mdm-2 phosphoryliert und damit den Übertritt in den Nukleus ermöglicht.

Mögliche weitere Funktionen für PKB/Akt im Rahmen der Onkogenese sind die Phosphorylierung und Aktivierung der *endothelial nitric oxide synthase* (eNOS), welche mit dem Prozess der Neovaskularisation und VEGF-induzierter Endothelzell-Migration in Verbindung gebracht wird (Fulton et al. 1999). Desweiteren phosphoryliert PKB/Akt hTERT, die katalytische Einheit der menschlichen Telomerase, und führt so zu einer verstärkten Aktivierung (Kang et al. 1999).

1.4.1.2. Adhärenz-vermittelte Chemo-/Radioresistenz

Die Adhärenz-vermittelte Chemo-/Radioresistenz stellt ein Modell dar, welches ebenfalls auf einer Inhibition der Apoptose beruht. Eine Zelle erhält von extrazellulär Signale, indem diese zum Beispiel durch gelöste Faktoren, durch eine interzelluläre Adhärenz mit benachbarten Zellen oder durch eine Adhärenz an die Bestandteile der Basalmembran oder der extrazellulären Matrix (EZM) übertragen werden (Dalton 1999). Die normale epitheliale Zelle braucht diese Signale zum Überleben. Wird sie zum Beispiel von der Basalmembran abgelöst, mündet dies in einer Aktivierung des Apoptoseweges, ein Phänomän welches Anoikis (griechisch für Heimatlosigkeit) genannt wird (Frisch and Francis 1994). Der Signalweg, der Anoikis vermittelt, läuft über die Integrine, welche die extrazelluläre Adhärenz vermitteln, über die PI₃-Kinase und PKB/Akt (Khwaja et al. 1997). Adhärenz an die extrazelluläre Matrix bedeutet also Auslösung eines antiapoptotischen Signals in normalen epithelialen Zellen.

Für SCLC-Zelllinien haben schon Fridman et al. (1990) gezeigt, daß diese resistenter gegenüber mehreren Zytostatika sind, wenn sie auf Laminin, einem Bestandteil der EZM, kultiviert werden, was mit einer Morphologieänderung durch die Adhärenz einhergeht.

Sethi et al. (1999) haben diesen Gedanken fortgeführt und gezeigt, daß SCLC-Zelllinien an den EZM-Bestandteilen Laminin, Fibronectin und Kollagen IV adhären werden und

deutlich resistenter gegen Doxorubicin, Cyclophosphamid und Etoposid sind. Die Fraktion der apoptotischen Zellen unter Zytostatika-Exposition war signifikant kleiner in den an den EZM-Bestandteilen adhären Zellen. Mit einem Antikörper gegen $\beta 1$ -Integrine konnten sie den EZM-Matrix-vermittelten Apoptoseschutz gegen die Zytostatika wieder aufheben, was die Integrine als Mediator dieses Adhärenz-vermittelten Anti-Apoptosesignals identifiziert.

Ein ähnliches Modell zeigten Damiano et al. (1999) für Myelomzellen. Diese werden, wenn Sie auf Fibronektin kultiviert werden, über das $\alpha 4 \beta 1$ -Integrin an Fibronektin adhären, was ein anti-apoptotisches Signal überträgt, welches sie vor Zytostatika-induzierter Apoptose schützt. Die Autoren prägten dafür den Ausdruck der *cell adhesion mediated-drug resistance* (CAM-DR). Über ähnliche Modelle berichteten auch Uhm et al. (1999); Taylor et al. (1999) oder de la Fuente et al. (2002).

1.4.2. Multi drug resistance (MDR)

Das Konzept der *multi drug resistance* (MDR) stellt ein ganz anderes Modell zur Erklärung der Chemoresistenz verschiedener Tumore dar, das auf Grund seiner weiten Verbreitung hier vorgestellt werden soll. Das Genprodukt des MDR1 Genes, das P-Glykoprotein (P-gp), stellt ein transmembranöses Protein dar, das an der Detoxifizierung der Zelle beteiligt ist, indem es an der Regulation des Effluxes diverser Toxine, inklusive verschiedenster Zytostatika, beteiligt ist. Der Mechanismus ist dabei umstritten, früher ging man von einer Art Pumpfunktion aus (Roepe 2000). Weitere ähnliche Proteine der MDR sind das *lung resistance protein* (LRP) und das *multidrug resistance protein* (MRP). Die klinische Relevanz der MDR, besonders bei den soliden Lungentumoren, ist umstritten. Oka et al. (1997) finden bei nur 13 von 87 resezierten Lungentumoren eine Expression des MDR1-Genes, welche in keiner Weise mit der Ausprägung einer Chemoresistenz korreliert. Während Volm et al. (1997) in 45% von 87 resezierten NSCLC die Expression von LRP finden und diese mit einer Resistenz gegenüber Doxorubicin korreliert, ist bei Dingemans et al. (1996) die Expression von LRP in ihren NSCLC Patienten kein prognostischer Faktor für das Überleben und die LRP-Expression korreliert nicht mit der Sensitivität für Zytostatika.

1.5. Aufgabenstellung

Das kleinzellige Bronchialkarzinom (SCLC) ist ein primär meist gut auf Chemo-/Strahlentherapie reagierender Tumor, der aber fast immer innerhalb kurzer Zeit eine sekundäre Chemo- und Strahlentherapieresistenz entwickelt. Dies korreliert *in vivo* mit dem Auftreten von varianten/kombinierten SCLC, die nicht nur eine rein kleinzellige, sondern auch Anteile einer nichtkleinzelligen Histologie aufweisen. Die Mechanismen dieser sekundären Resistenz sind weitgehend ungeklärt, nicht zuletzt, da eindeutige Zellkulturmodelle, an denen diese Resistenz untersucht werden kann, fehlen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit einem neu etablierten Zellkulturmodell, welches aus den drei in Suspension wachsenden kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien NCI-H69, NIH-N592 und NCI H82 besteht. In unserer Arbeitsgruppe gelang es, von diesen in Suspension wachsenden Zelllinien adhärenz wachsende Subklone zu kultivieren. Dies ergibt ein Modell, in dem die Suspensions-Ausgangszelllinie direkt mit dem adhärenz Subklon verglichen werden kann.

Die Zelllinien wurden zunächst auf eine differentielle Genexpression, z.B. der neuroendokrinen Marker, untersucht. Im Folgenden wurde das Zellkulturmodell auf Unterschiede im Chemo- und Radioresistenzverhalten überprüft. Anschließend wurde untersucht, inwieweit Resistenzen durch Beeinflussung von Apoptosewegen herbeigeführt werden und verantwortliche Signalwege dafür identifiziert.

Auf der Grundlage dieses Modells gewonnene Erkenntnisse sollen helfen, die sekundäre Chemo-/Radioresistenz besser zu verstehen und neue, wirksamere Therapiekonzepte zu entwickeln.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

| | |
|--------------------------------------------------|-----------------------------|
| Autoklav 5075 ELV | Tuttnauer, USA |
| Digitalkamera Coolpix 950 | Nikon, Japan |
| Durchlicht-Mikroskop Leitz Labovert | Leica, Schweiz |
| ELISA Betriebssoftware Genesis Lite; Version 3,0 | Life Sciences, UK |
| ELISA Reader Multiscan RC | Labsystems, USA |
| Heraeus-Zentrifugen | Heraeus, Hanau |
| Fluoreszenz-Mikroskop Diaplan Vario-Orthomat | Leica, Schweiz |
| GeneAmp PCR System 9600 | Perkin Elmer, USA |
| Inkubator | Heraeus, Hanau |
| Sterilbank Herasafe HS12 | Heraeus, Hanau |
| Ultrospec 3000 Photometer | Pharmacia Biotech, Schweden |

2.1.2. Zelllinien

Alle Zelllinien wurden erhalten von der American Type Culture Collection (ATCC), USA

| | |
|-----------|-------|
| NCI-H69 | SCLC |
| NIH-N592 | SCLC |
| NCI-H82 | SCLC |
| LCLC-103H | NSCLC |

2.1.3. Zellkulturmaterial

| | |
|-----------------------------|------------------------------|
| Accutase | PAA Laboratories, Österreich |
| Aqua ad injectabilia | Braun, Melsungen |
| Bovines Serum Albumin (BSA) | Sigma, München |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Serva, Heidelberg |
| EDTA 0,02% | Boehringer, Mannheim |
| Fetales Kälberserum (FKS) | Gibco BRL, Eggenstein |
| Gewebekulturschalen | Sarstedt, Nümbrecht |
| Lipofectin | Gibco BRL, Eggenstein |

| | |
|------------------------------------|------------------------|
| Neubauerzählkammer | Braun, Melsungen |
| Opti-MEM | Gibco BRL, Eggenstein |
| PBS-Konzentrat (10%) | Behring-Werke, Marburg |
| RPMI 1640 Medium (1% L-Glutamin) | Gibco BRL, Eggenstein |
| Sterilfilter | Millipore, Molsheim |
| Trypsin 2,5% | Gibco BRL, Eggenstein |
| Zellkulturflaschen | Greiner Frickenhausen |
| Zellkulturröhrchen 50 ml und 15 ml | Greiner, Frickenhausen |
| 6-well und 24-well Platten | Nunc, USA |

2.1.4. Chemikalien

| | |
|---------------------------|------------------------------------------------------------|
| Agarose | Roth, Karlsruhe |
| EDTA | Roth, Karlsruhe |
| Ethanol absolut | J. T. Baker, Holland |
| Ethanol 70%, vergällt | Apotheke des Klinikums der Philipps-Universität Marburg |
| Hoechst 33342-Farbstoff | Sigma, München |
| Isopropanol | Riedel-deHaen, Sigma, Seelze |
| KCl | Merck, Darmstadt |
| KH_2PO_4 | Merck, Darmstadt |
| NaCl | Merck, Darmstadt |
| Na_2HPO_4 | Merck, Darmstadt |
| Propidiumiodid | Sigma, München |
| Proteinase K | Qiagen, Hilden |
| RNAse A (10 mg/ml) | Sigma, München |
| TRIS-hydrochlorid | Roth, Karlsruhe |

2.1.5. Lösungen und Puffer

| | |
|-------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| PBS | 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ 1,4 mM KH ₂ PO ₄ |
| TE | 10 mM Tris, pH 8,0 1 mM EDTA, pH 8,0 |
| Hoechst 33342/ Propidiumiodid-Färbelösung | Hoechst 33342 10 µM Propidiumiodid 6,6 µg/ml in PBS |
| Einfrierpuffer | 7,5% FKS in DMSO |

2.1.6. Kits und sonstiges

| | |
|-------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| AmpFISTR Profiler PCR Amplification Kit | Promega, Heidelberg |
| ApoAlert Caspase-3 Assay Kit | Clontech, Heidelberg |
| CellTiter 96 Aqueous One Solution Proliferation Assay | Promega, Heidelberg |
| PKB/Akt Antisense- und Missense-Oligonukleotide | Dr. Emily Slater, Institut für Tumorforschung und Molekularbiologie (IMT), Marburg |
| Qiagen Genomic-tip 500/G Kit | Qiagen, Hilden |

2.2. Methoden**2.2.1. Zellkultur****2.2.1.1. Kultivierung adhärenter Subklone von Suspensionszelllinien**

Grundlage dieser Arbeit sind die drei kleinzelligen Bronchialkarzinom-Zelllinien NCI-H69, NIH-N592 und NCI-H82 (siehe Tabelle 2-1).

| Bezeichnung | Histologie und Herkunft |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| NCI-H69 | klassisches SCLC wächst in Suspension von einem 55-jährigen Mann |
| NIH-N592 | klassisches SCLC wächst in Suspension von einer Knochenmarkmetastase eines männlichen Nichtraucher |
| NCI-H82 | variantes SCLC wächst in Suspension aus dem Pleuraerguß eines 40-jährigen Mannes |

Tab. 2-1: Grundlage dieser Arbeit: Die drei in Suspension wachsenden Ausgangszelllinien

Diese Zelllinien wurden routinemäßig in Kultur passagiert. Sie schwimmen ohne Bezug zum Boden frei flottierend im Medium (*anchorage independent*) und bilden gewöhnlich dicht zusammengeballte Aggregate zu Hunderten von Zellen. Diese Wachstumsform wird als „in Suspension“ wachsend bezeichnet, die einzelne Zelle nimmt dabei eine kugelige Form an.

In unserer Arbeitsgruppe wurde beobachtet, wie sich gelegentlich vereinzelt Zellen am Boden der Zellkulturflaschen absetzten, ihre Morphologie zu einem flach ausgezogenem, epitheloiden Zelltyp änderten und adhärent zum Zellkulturflaschenboden wuchsen. Durch Subkultivierung dieser Zellen gelang es, adhärente Subklone von den in Suspension wachsenden Ausgangszelllinien zu etablieren. Diese Subklone wuchsen stabil als adhärente, epitheloide Zellen auf den routinemäßig verwendeten, lediglich Poly-L-Lysin beschichteten Zellkulturflaschen der Firma Greiner (Fotos siehe Abb. 3-1 bis 3-3). Diese Klone setzten sich also nicht nur am Boden ab, wie es gelegentlich als Stressreaktion zu beobachten ist, sondern änderten Ihre Morphologie dauerhaft im Sinne eines epitheloid adhären Wuchses und waren so fest auf dem Boden der Zellflasche angeheftet, daß sie nur durch Hinzufügen von Trypsin (0,25%) vom Boden zu lösen waren, nicht jedoch durch EDTA (0,02%) oder festes Schlagen gegen den Flaschenrand.

In dieser Arbeit werden die adhären Subklone zur Kennzeichnung mit dem Kürzel „ad“ versehen; den in Suspension wachsenden Ausgangszelllinien wird zur besseren Unterscheidung das Kürzel „sus“ hintenangestellt (siehe Tabelle 2-2).

| Suspensions-Ausgangszelllinie (Kurzname) | adhärenter Subklon (Kurzname) |
|-------------------------------------------------|--------------------------------------|
| NCI-H69 sus (H69sus) | NCI-H69 ad (H69ad) |
| NCI-H82 sus (H82sus) | NCI-H82 ad (H82ad) |
| NIH-N592 sus (N592sus) | NIH-N592 ad (N592ad) |

Tab. 2-2: Die Nomenklatur von Suspensions-Ausgangszelllinie und adhärentem Subklon, einschließlich der Kurznamen der Zelllinien, die meist in dieser Arbeit verwendet werden.

Als nichtkleinzellige Kontrollzelllinie wurde in einigen Experimenten die Linie LCLC-103H mitgeführt.

| Bezeichnung (Kurzname) | Histologie und Herkunft |
|-------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| LCLC-103H (103H) | Großzelliges Bronchialkarzinom wächst adhärent zum Zellkulturflaschenboden von einem Pleuraerguß eines 61 jährigen Mannes, der bereits eine Radio-/ Chemotherapie erhalten hatte |

Tab. 2-3: Die nichtkleinzellige Kontrollzelllinie LCLC-103H

2.2.1.2. Kultivierung der Zelllinien

Die Zelllinien wurden routinemäßig in RPMI 1640, welches durch 10% fetales Kälberserum supplementiert war, in mittelgroßen Greiner-Zellkulturflaschen kultiviert. Diese Zellkulturflaschen, sowie das gesamte weitere, zur Kultivierung der Zellen genutzte Material (z. B. 6-well-Platten, 96-well-Platten, etc.) sind standardmäßig Poly-L-Lysin beschichtet. Umgesetzt wurden die Suspensionszelllinien, wenn die Farbe des Mediums (als Indikator für den pH-Wert) vom rötlichen ins gelb-orange wechselte; die adhärenen Linien, wenn sie beinahe Konfluenz am Zellflaschenboden erreichten. Zur Umsetzung auf eine neue Zellkulturflasche wurden die Flaschen der Suspensions-Zelllinien schräg gestellt, damit die Zellaggregate in einer Ecke der Flasche absinken konnten, woraufhin das verbrauchte überstehende Medium abgenommen werden konnte. Nun wurde etwa ein Zehntel der Zellen mit frischem Medium in eine neue Flasche gegeben. Bei den adhärenen Zellen wurde der Überstand direkt abgenommen, sie wurden mit circa 5 ml PBS gespült und dann zum Ablösen mit 2 ml Trypsin (0,25%) versehen. Nach circa 5 Minuten lösten sich die Zellen vom Boden ab und wurden im Verhältnis von 1:10 mit frischem Medium in eine neue Flasche gegeben.

2.2.1.3. Kultivierung der adhärennten Zellen auf unbeschichteten Bakterienkulturschalen

Setzte man die Zellen nicht auf Poly-L-Lysin beschichtete Zellkulturgefäße, sondern auf völlig unbeschichtete Bakterienkulturschalen der Firma Sarstedt, so ließen sich die adhärennten Subklone H69ad, N592ad und H82ad wieder in ihren ursprünglichen Phänotyp (kleine, kugelige, in Suspension schwimmende Zellen) zurückführen. Die Kultivierung erfolgte sonst unverändert nach der oben beschriebenen Art und Weise.

2.2.2. Bestrahlung der Zelllinien

Die Bestrahlung der Zelllinien fand in der Abteilung für Strahlentherapie der Philipps-Universität Marburg (Leiterin: Frau Prof. Dr. med. Engenhardt-Cabillic) unter der freundlichen Zusammenarbeit mit Herrn Dr. med. Markus Gross statt. Benutzt wurde ein Kobalt-60 Bestrahlungsgerät, welches 1,3 MeV-Gamma-Strahlen emittiert. Die Zellschalen oder Zellkulturflaschen, die am Vortag in definierter Zahl ausplattiert worden waren, wurden in 80 cm Entfernung von der Strahlenquelle auf einer 10 mm dicken Plexiglasplatte (Verstärkung der Strahlenwirkung durch den Compton-Effekt) positioniert. Die Feldgröße war 30 cm x 30 cm, wurde jedoch immer nur innerhalb 20 cm x 20 cm genutzt, da die Feldinhomogenitäten bereits innerhalb 10 cm x 10 cm 1-2% betragen und nach außen hin zunehmen. Die Bestrahlungszeit wurde anhand der Halbwertszeit für Kobalt (1925,5 Tage) bei jedem Termin neu errechnet und lag bei 2 Gy zwischen 2,01 min und 2,04 min bzw. bei 8 Gy zwischen 8,01 min und 8,16 min.

2.2.3. Proliferationsassays

Zur präzisen und einfachen Bestimmung der Zellzahl wurde das *Cell Titer 96 one solution* Reagenz von Promega verwendet. Stoffwechselaktive Zellen reduzieren das Substrat dieses Kits (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3carboxymethoxyphenyl)-2-(4sulphophenyl)-2H-tetrazolium (MTS)) in den braunen Farbstoff Formazan. Dieser ist wasserlöslich und besitzt ein Absorptionsmaximum bei 490 nm. Nach einer Inkubationszeit von 4 h konnte so die optische Dichte, die direkt proportional zur Zellzahl ist, im Photometer oder im *ELISA-Reader* bestimmt werden.

2.2.3.1. Proliferationsassays nach Bestrahlung

Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase wurden geerntet, in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und in einer Konzentration von $1,5 \times 10^4$ Zellen/100 μ l auf 96-well-Platten ausgesät. Pro Bedingung wurden 8 wells (1 Spalte/Platte) ausplattiert. Am

folgenden Tag wurden die Platten wie oben beschrieben bei 2 Gy oder bei 8 Gy bestrahlt. Daraufhin wurde an den Tagen 1, 2 und 3 nach Bestrahlung die Zellzahl ermittelt, indem 10 µl des *Cell Titer 96 one solution* Reagenz pro well zugegeben wurde und die optische Dichte ermittelt wurde. Die ermittelten Absorptionswerte für die bestrahlten Zellen wurden ins Verhältnis zur unbestrahlten Kontrolle gesetzt.

2.2.3.2. Proliferationsassays zur Ermittlung der Resistenz gegen Zytostatika

Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase wurden geerntet, in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und in einer Konzentration von $1,0 \times 10^4$ Zellen/50 µl auf 96-well-Platten ausgesät. Am folgenden Tag wurde zu diesen Platten weitere 50 µl Medium mit dem entsprechenden Zytostatikum in 10 verschiedenen Konzentrationen gegeben. Pro Bedingung wurden wiederum 8 wells angesetzt. Am fünften Tag nach Zugabe des Zytostatikums wurde die Zellzahl bei den verschiedenen Konzentrationen wie oben beschrieben ermittelt und ins Verhältnis einer mitgeführten unbehandelten Kontrolle gesetzt.

2.2.4. Apoptoseassays

2.2.4.1. Hoechst 33342/Propidiumiodid-Färbung

Mit der Hoechst 33342/Propidiumiodid-Färbung (auch *live-dead-staining*) ist es möglich, die apoptotische Zellfraktion direkt im Fluoreszenzmikroskop zu bestimmen. Der Hoechst-Farbstoff wird in doppelsträngige DNA vitaler wie nicht vitaler Zellen eingelagert. Er kann also leicht Membranen durchdringen, seine Farbe ist hellblau-grünlich. Propidiumiodid (PI) wird ebenfalls in DNA eingelagert, kann aber in vitalen Zellen die cytoplasmatische Membran nicht passieren. PI färbt avitale Zellkerne kräftig rosa-rot. So wird die Beurteilung der Zellkerne möglich. Unterschieden werden die Zellkerne in normal vital (rund, homogen Hoechst 33342 gefärbt, relativ gesehen groß), apoptotisch (kleiner, fragmentiert, kondensiert) und nekrotisch (groß, geschwollen, zerrissen, PI-gefärbt).

Die Zellen wurde gezählt und in einer definierten Anzahl auf 6-well-Platten ausgesät (z.B. 5×10^5 Zellen auf 5 ml). 24 Stunden später erfolgte eine Bestrahlung mit Gamma-Strahlen der Intensität 2 Gy und 8 Gy. Am dritten Tag nach Bestrahlung wurden die Zellen geerntet, wobei darauf zu achten war, den Überstand der adhärennten Zellen nicht zu verwerfen, sondern mit zu zentifugieren und zu färben, da sich apoptotischen Zellen eventuell vom Boden ablösen und im Überstand anreichern. Dann wurde zentrifugiert (800 rpm, 5 min.),

der Überstand dekantiert und das Zellaggregat vorsichtig in 100 µl der Färbelösung (10 µM Hoechst 33324 und 6,6 µg/ml PI in PBS) resuspendiert. Nach 20 Minuten Inkubationszeit im Dunklen bei Raumtemperatur wurden 15 µl der Zellsuspension auf einen Objektträger gegeben, mit einem Deckglas bedeckt und sofort unter dem Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet. Pro Präparat wurden mindestens drei Gesichtsfelder ausgezählt.

2.2.4.2. Caspase-3-Assay

Die Caspasen gehören zu den ausführenden Enzymen des Apoptoseprogramms. Nach ihrer Aktivierung spalten sie mit hoher Substratspezifität eine Reihe von zellulären Schlüsselproteinen und sind so die Effektoren der Apoptose (siehe Kapitel 1.3). Diese Spaltfunktion macht sich der Caspase-3-Assay zunutze, indem DEVD-pNA als Substrat angeboten wird, welches von der aktiven Caspase-3 in DEVD und pNA (p-Nitroanilid) gespalten wird. pNA ist ein Farbstoff mit einem Absorptionsmaximum bei 405 nm, der leicht in einem Photometer/*ELISA-Reader* quantifiziert werden kann und so einen direkten Rückschluß auf die Caspase-3-Aktivität und damit die Apoptosefraktion erlaubt.

Es wurden 5×10^6 Zellen in einer mittelgroßen Zellkulturflasche ausgesät und am folgenden Tag bei 2 Gy und 8 Gy bestrahlt. Eine unbestrahlte Kontrollschale wurde ebenfalls mitgeführt. Am zweiten Tag nach Bestrahlung wurden die Zellen geerntet, die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt und in einer Zahl von 2×10^6 Zellen für den Assay in 15-ml-Zellröhrchen eingesetzt. Pro Bedingung (0 Gy, 2 Gy und 8 Gy) wurden 2 Ansätze durchgeführt. Nun wurden die Zellen 10 min bei 800 rpm zentrifugiert, der Überstand dekantiert, ein verbleibender Resttropfen Medium/PBS vorsichtig abgesaugt und die Zellen in 50 µl eisgekühltem Lysis Buffer aus dem Caspase-3-Assay-Kit resuspendiert. Nach 10 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellysate bei 2500 rpm für 3 min bei 4°C zentrifugiert, um die zellulären Bestandteile zu sedimentieren. Zu dem Überstand, der in 2ml-Eppendorf-Cups überführt wurde, wurden 50 µl 2x Reaktionspuffer und 5 µl DEVD-pNA aus dem Caspase-3-Assay-Kit hinzugefügt. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurden 100 µl der Lösung in einer 96-well-Platte mittels des *ELISA-Readers* gemessen. Als Kontrolle, gegen die gemessen wurde, wurde für jede Bedingung (0 Gy, 2 Gy und 8 Gy) Zellen analog durchs Protokoll geführt, jedoch kein Substrat (DEVD-pNA) zugegeben. Desweiteren wurde eine Kontrolle durchgeführt, bei der dem 2x Reaktionspuffer ein Caspase-3-Inhibitor zugegeben wurde.

Nach Ermittlung der Absorptionswerte ist eine Umrechnung in eine rechnerische Größe, die Caspase-Einheit, möglich. Hierzu mißt man eine Standardkurve mit verschiedenen Konzentrationen eines im Kit mitgelieferten pNAs und bestimmt die Steigung der Gerade, die man erhält, per linearer Regression. Die Caspase-Einheit ist dann die gemessene optische Dichte/Grad der Steigung.

2.2.5. Proteinkinase B/Akt-Antisense-Oligonukleotide

Möchte man die Funktion eines Proteins für die Zelle genau analysieren, ist es ein eleganter Ansatz, das Protein mittels Transfektion von Antisense-Oligonukleotiden spezifisch auszuschalten. Die Sequenz der Antisense-Oligonukleotide ist so gewählt, daß sie zu einem kurzen Stück der mRNA des Zielproteins komplementär ist, sich anlagert und so die Translation der mRNA in das Protein inhibiert.

Wichtig ist die Mitführung von Missense-Oligonukleotid-Kontrollen, also in der Sequenz leicht abgeänderte Oligonukleotide, die sich nicht an die mRNA anlagern. So können unspezifische toxische Wirkungen der Oligonukleotide kontrolliert werden.

In unserem Falle war es möglich, in Zusammenarbeit mit Emily Slater, Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT), Philipps-Universität Marburg, die von ihr entwickelten, gegen die Proteinkinase B/Akt gerichteten Antisense-Oligonukleotide zu nutzen. Das Oligonukleotid besteht aus circa 15 Nukleinsäuren, deren Sequenz uns aus Patentschutzgründen nicht mitgeteilt wurde. Diese Oligonukleotide wurden im IMT synthetisiert und über HPLC gereinigt.

Die Transfektion wurde an zwei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt, am dritten Tag wurde dann ein Teil der Zellen mit Gamma-Strahlen der Stärke 2 Gy und 8 Gy bestrahlt, vom anderen Teil der Zellen wurde ein Proteinextrakt für einen PKB/Akt Western-Blot hergestellt (für die Durchführung der Western-Blots verantwortlich: Ines Ferber).

Die Transfektion wurde auf 6-well-Platten durchgeführt. Die adhärennten Zellen waren zwei Tage zuvor so ausgesät worden, daß sie am Transfektionstag nicht mehr als 70% konfluent waren. Die adhärennten Zellen wurden zweimal mit Opti-MEM gespült, die Suspensionszellen wurden geerntet, zentrifugiert (800 rpm, 5 min), mit Opti-MEM gewaschen und in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/800 µl/well gegeben. Parallel dazu wurde der Transfektions-Mix vorbereitet: Zur Erhöhung der Transfektionseffizienz wurde Lipofectin verwendet. Pro Ansatz wurde 10 µl Lipofectin 45 min bei Raumtemperatur mit 100 µl Opti-MEM inkubiert. Daraufhin wurden weitere 100 µl Opti-MEM und das

Antisense-Oligonukleotid entsprechend einer Endkonzentration von 30 nM, 100 nM und 300 nM zugegeben. Dieser Transfektions-Mix konnte nach 15 min direkt zu den Suspensionszellen bzw. mit weiteren 800 µl zu den adhären Zellen pipettiert werden. Nun standen die Zellen 6 h bei 37°C im Inkubator. Danach wurde den Suspensionszellen 4 ml normales, serumhaltiges Medium zugegeben, bei den adhären Zellen wurde der Transfektions-Mix abgenommen und dann 5 ml Medium hinzugefügt. Als Kontrollen wurden Zellen mit Lipofectin alleine (ohne Oligonukleotide), Zellen ohne Lipofectin und Zellen mit einem Missense-Oligonukleotid gleicher Konzentration (30 nM, 100 nM und 300 nM) mitgeführt. Für die Herstellung des Proteinextraktes war es wichtig, die Zellen direkt nach dem Ablauf der Transfektion am 2. Tag für 24 h unter völlig serumfreien und Opti-MEMfreien Bedingungen zu halten, da PKB/Akt durch die Wachstumsfaktoren im Serum und auch durch das insulinhaltige Opti-MEM aktiviert wird.

2.2.6. Durchflußzytometrische Zellzyklusanalyse

Im FACS-Gerät (*fluorescence activated cell scanning*) werden Signale einer Einzelzellsuspension analysiert die entstehen, wenn die Einzelzellsuspension in einem Flüssigkeitsstrahl durch das Feld eines Argon-Ionen Lasers geführt wird. Zur Zellzyklusanalyse misst man den DNA-Gehalt der Zellen. Dafür nutzt man die Eigenschaften des Fluoreszenzfarbstoffes Propidiumiodid (PI), welcher in fixierten Zellen die Zellmembranen durchdringen kann und sich in die DNA und die RNA einlagert. Zellen in der G1- oder G0-Phase mit einfachem Chromosomensatz können so anhand des weniger intensiven PI-Signals von Zellen in der G2-Phase mit dupliziertem Chromosomensatz unterschieden werden, das Signal von Zellen der S-Phase liegt zwischen den beiden Gruppen.

Bei der Präparation der Einzelzellsuspension war darauf zu achten, daß adhären Zellen maximal 70% Konfluenz erreicht hatten, also voll in der logarithmischen Wachstumsphase waren. Dann wurden die Zellen geerntet (5×10^5 Zellen), zentrifugiert (800 rpm, 5 min), mit PBS gewaschen, wiederum zentrifugiert und in 1 ml PBS aufgenommen. Nun wurde ein 15-ml-Zellröhrchen mit 3 ml kaltem Ethanol (absolut) vorbereitet und in dieses (auf dem Vortex zur Vermeidung von Zellklumpen) 1 ml der Zellsuspension gegeben. Die Zellen wurden über Nacht bei 4°C fixiert, zentrifugiert, in 1ml PBS resuspendiert und mit RNase A (50 µl/ml) für 15 min bei Raumtemperatur behandelt. So behandelt sind die Zellen

mehrere Tage bei 4°C haltbar. Erst direkt vor der Messung wurden sie mit 5 µg/ml PI gefärbt.

2.2.7. DNA-Extraktion aus Zelllinien

Zur Extraktion von DNA aus den Zelllinien wurde der “Qiagen Genomic-tip 500/G” Kit verwendet. Dieser Kit verwendet eine Säule, in der ein silikonhaltiges Harz aufgetragen ist, an dessen positive Ladungen die negativ geladenen Phosphatreste der DNA, in Abhängigkeit vom pH und der Salzkonzentration, binden können. Verunreinigungen wie RNA oder Proteine werden bereits bei mittleren Molaritäten an NaCl von der Säule gewaschen, während zum Eluieren der DNA hochmolare NaCl-Lösungen verwendet werden.

Zur DNA-Extraktion wurden Zellen, die nahezu konfluent auf mittelgroßen Zellkulturflaschen gewachsen waren, verwendet. Die adhärennten Zellen wurden zweimal mit 10 ml PBS gewaschen, dann wurde 8 ml gekühlte PBS und 2 ml Zelllyse-Puffer (aus dem Kit) in die Flasche gegeben. Die in Suspension wachsenden Zellen wurden in einem 50-ml- Zellröhrchen geerntet, zentrifugiert (800 rpm, 5 min), der Überstand dekantiert, das Zellaggregat erneut mit PBS gewaschen, zentrifugiert und dann ebenfalls mit 8 ml gekühlter PBS und 2 ml Zelllyse-Puffer versehen. Die Zelllysate wurden dann mit 15 µl RNase A (10mg/ml) bei 37°C für 2 h inkubiert und daraufhin mit 2 µl Proteinase K (20 µg/µl) über Nacht verdaut. Im folgenden Säulenaufreinigungsschritt wurden die Säulen zunächst mit 10 ml des Puffers QBT equilibriert. Für den Durchfluß durch das Harz der Säule wurde, wie in allen anderen Schritten auch, alleine die Schwerkraft genutzt. Daraufhin wurde das Zelllysate 10 sec gevortext und auf die Säule gegeben. Es folgten zwei Waschschrte mit 15 ml des Puffers QC und der Eluationsschritt mit 15 ml des Puffers QF, wobei das Eluat in einem 50-ml-Zellröhrchen aufgefangen wurde. Nun wurde zum Fällern der DNA 10,5 ml Isopropanol zugegeben. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (2500 rpm, 15 min). Anschließend wurde das DNA-Aggregat mit 4ml 70% Ethanol gewaschen und wiederum zentrifugiert (2500 rpm, 10 min). Nachdem der Überstand nun vorsichtig abgesaugt wurde, wurde das Aggregat 5 min luftgetrocknet und in 1ml TBE aufgenommen. Nachdem es vollständig gelöst war, wurde die Konzentration der DNA bestimmt, indem die Absorption der 1:100 und der 1:50 verdünnten DNA in einer Quarzküvette bei 260nm im Photometer bestimmt wurde. Außerdem wurde 1µl der DNA in einem 0,5% Agarose-Gel aufgetragen und so die Integrität der genomischen DNA beurteilt.

2.2.8. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion erlaubt es, beliebige DNA-Abschnitte ohne Verwendung von Vektoren oder Wirtszellen *in vitro* zu amplifizieren. Dafür benutzt man einen Mix, in den neben der zu amplifizierenden DNA spezifisch gewählte Oligonukleotide, sogenannte Primer, gegeben werden. Sie binden jeweils an die Enden des zu amplifizierenden DNA-Stückes. Von ihnen aus startet die Neusynthese eines DNA-Stranges durch die ebenfalls zugegebene hitzestabile DNA-Polymerase, die Taq-Polymerase. Die Amplifikation verläuft in etwa 25-35 Zyklen, ein Zyklus besteht aus der Trennung von DNA-Doppelsträngen in Einzelstränge bei 95°C (Denaturierung), der folgenden Anlagerung (*annealing*) der Primer bei circa 55-65°C und der DNA-Synthese bei 72°C (Elongation). Man erreicht durch dieses Vorgehen eine nahezu exponentielle Vermehrung des gewünschten Fragments, da im nächsten Zyklus das eben synthetisierte Produkt bereits wieder als Matritze für die Primer und damit für die Amplifikation dient.

2.2.8.1. PCR-Amplifikation von Mikrosatelliten

Polymorphe DNA-Marker werden Mikrosatelliten genannt. Die einzelnen Allele unterscheiden sich durch die variable Zahl sogenannter Tandem- oder Tetra-Nucleotid-Wiederholungen. Einzelne Individuen unterscheiden sich in der Länge (Basenzahl) dieser polymorphen Marker. Durch Amplifikation mehrerer solcher Marker kann so im PCR-Ansatz nachgewiesen werden, ob Material, in diesem Fall verschiedene Klone einer Zelllinie, wirklich von ein und dem selben Individuum stammen.

Für die Analyse wurde der AmpFISTR Profiler PCR Amplification Kit verwendet. In einem einzigen Ansatz werden mit Fluoreszenz-markierten Primern zehn verschiedene "*short tandem repeat*"-Loci amplifiziert.

Es wurden 1,25 ng DNA pro Ansatz in 10 µl TE eingesetzt und zu 15 µl des unten angegebenen Mastermixes gegeben. Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

| PCR-Programm | Mastermix |
|-----------------------|------------------------------------|
| 95°C, 11min | 10,5µl AMPFISTR PCR-Reaction Mix |
| 28 Zyklen: 94°C, 1min | 5,5µl AmpFISTR Profiler Primer Set |
| 59°C, 1min | 0,5µl Amplitaq Gold DNA Polymerase |
| 72°C, 1min | |
| 60°C, 45min | |

Tab. 2-4: Das PCR-Programm und die Zusammensetzung des Mastermixes

Die folgende Auftrennung der PCR-Produkte mittels denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese und die Auswertung mittels GeneScanner führte freundlicherweise Dr. med. Cornelia Brendel, Zentrum für Innere Medizin, Abteilung für Hämatologie/Onkologie/Immunologie der Philipps-Universität Marburg für unsere Arbeitsgruppe durch.

3. Ergebnisse

3.1. Kultivierung adhärenter Subklone

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden an den kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen NCI-H69 (ein klassisches SCLC), NIH-N592 (ein klassisches SCLC) und NCI-H82 (ein als variant beschriebenes SCLC (Gazdar et al. 1985)) gewonnen. Die Zellen schwimmen ohne Bezug zum Boden frei flottierend im Medium und bilden gewöhnlich dicht zusammengeballte Aggregate zu Hunderten von kleinen, kugeligen Zellen. Diese Wachstumsform wird als „in Suspension wachsend“ bezeichnet.

In unserer Arbeitsgruppe wurde beobachtet, wie sich gelegentlich vereinzelte Zellen am Boden der Zellkulturflaschen absetzten, ihre Morphologie zu einem flach ausgezogenem, epitheloiden Zelltyp änderten und adhärent am Zellkulturflaschenboden wuchsen. Durch Subkultivierung dieser Zellen ist es gelungen, adhärente Subklone von den in Suspension wachsenden Ausgangszelllinien zu etablieren. Diese Subklone wuchsen stabil als adhärente, epitheloide Zellen auf den routinemäßig verwendeten, lediglich Poly-L-Lysin beschichteten Zellkulturflaschen der Firma Greiner (siehe Abb. 3-1, 3-2 und 3-3).

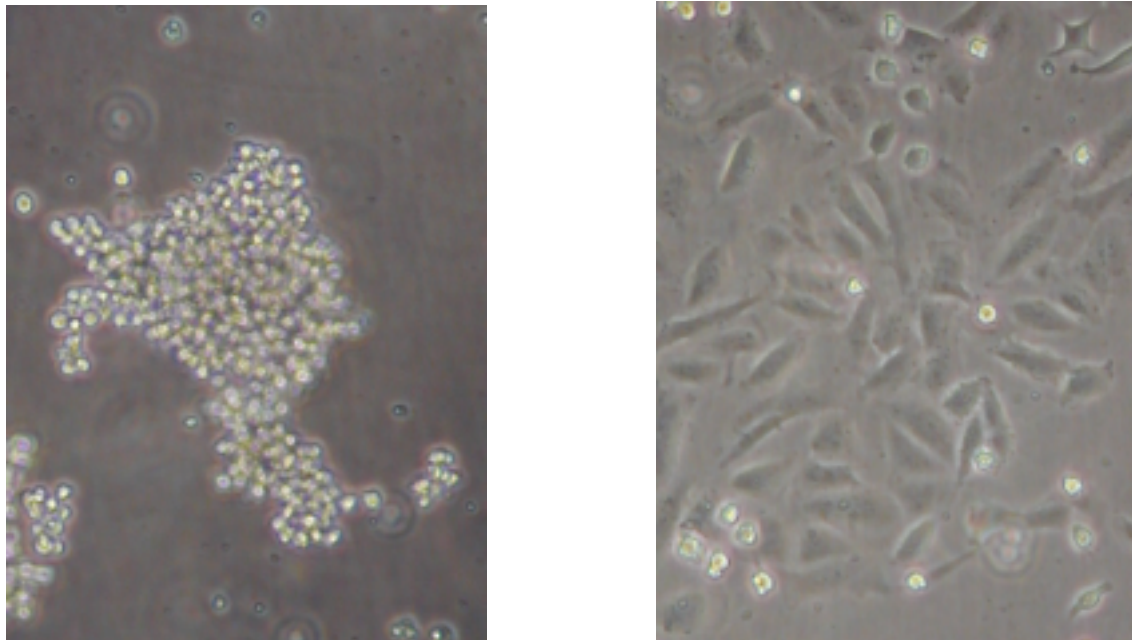


Abb. 3-1: Die Zelllinien H69sus (links) und H69ad (rechts).

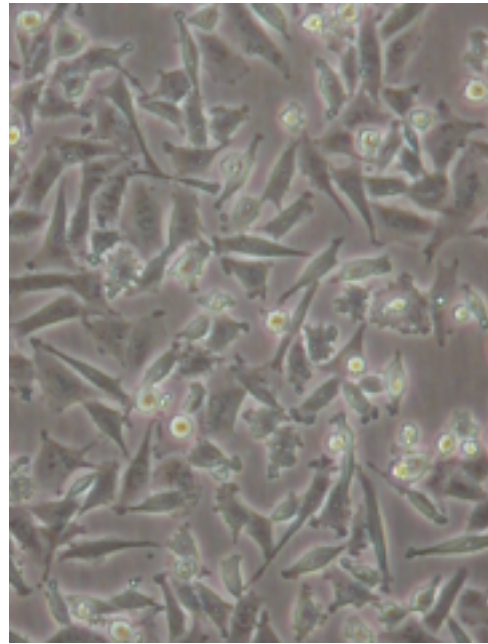
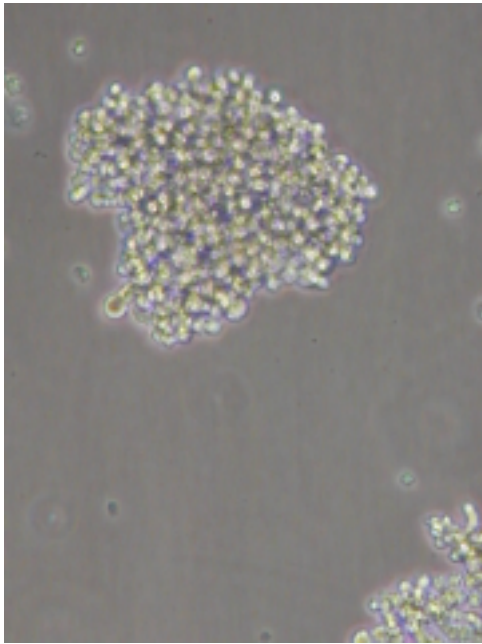


Abb. 3-2: Die Zelllinien N592sus (links) und N592ad (rechts).

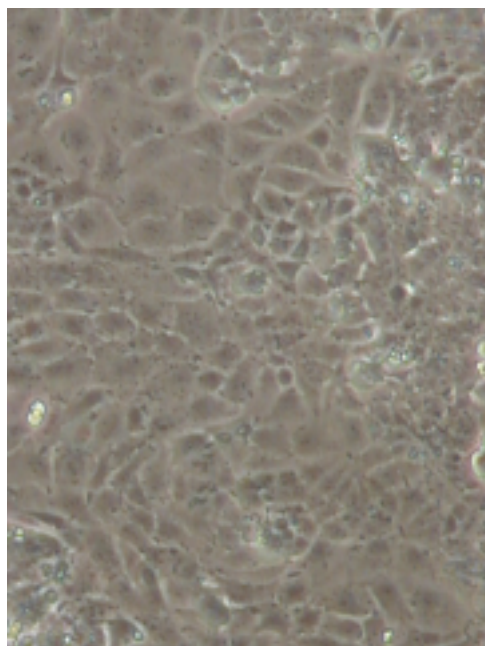
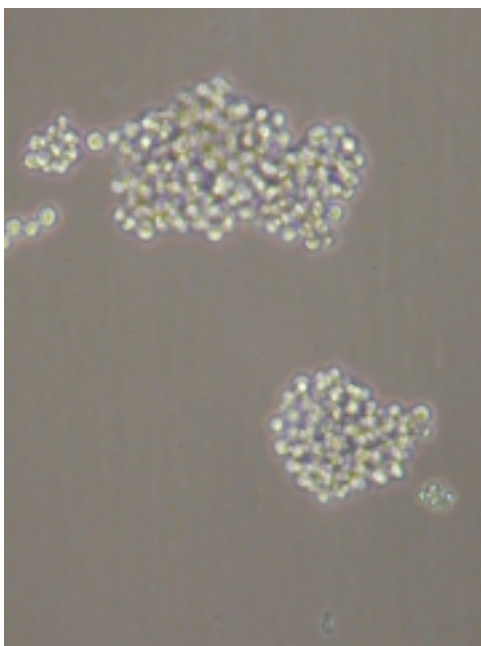


Abb. 3-3: Die Zelllinien H82sus (links) und H82ad (rechts)

Man erkennt auf den Abbildungen links die kleinen, kreisrunden Zellen der Suspensions-Ausgangszelllinien, die in frei flottierenden Aggregaten wachsen, bestehend aus Hunderten von zusammengeballten Zellen. Im Gegensatz dazu wachsen die adhärenenten Zellen (rechts

in den Abbildungen) flach und ausgezogen am Boden der Zellkulturflasche. Sie erscheinen dunkler, da das Licht durch die am Boden angehefteten Zellen nur einmal gebrochen wird.

Die Adhärenz am Kulturflaschenboden war so stark ausgeprägt, daß die Zellen nur durch Anwendung von Trypsin (0,25%) vom Boden zu lösen waren, nicht jedoch durch einfaches Schlagen an den Zellkulturflaschenrand.

Die adhärenenten Subklone werden zur Kennzeichnung in dieser Arbeit mit dem Kürzel “ad” versehen; den in Suspension wachsenden Ausgangszelllinien wird zur besseren Unterscheidung in dieser Arbeit das Kürzel “sus” hintenangestellt. Statt der offiziellen Bezeichnung werden auf Grund der Länge in dieser Arbeit Kurznamen verwendet, z. B. für NCI-H69 sus kurz H69sus, für eine Übersicht siehe Tabelle 2-2.

3.2. Die Zelllinien H69sus und H69ad sind genetisch identisch

Um den Beweis anzutreten, daß die kultivierten adhärenenten Subklone nicht etwa durch eine Kontamination mit Zellen einer anderen adhärenenten Zelllinie verursacht worden sind, wurde von den Zelllinien H69sus und H69ad exemplarisch DNA isoliert und eine Mikrosatelliten-Analyse durchgeführt. Es wurde ein Kit verwendet, der einen Primer-Mix für 10 verschiedene Loci, allesamt polymorphe Marker, beinhaltet. Diese Loci wurden mittels PCR amplifiziert und mit dem GeneScanner visualisiert (siehe Abb. 3-4).

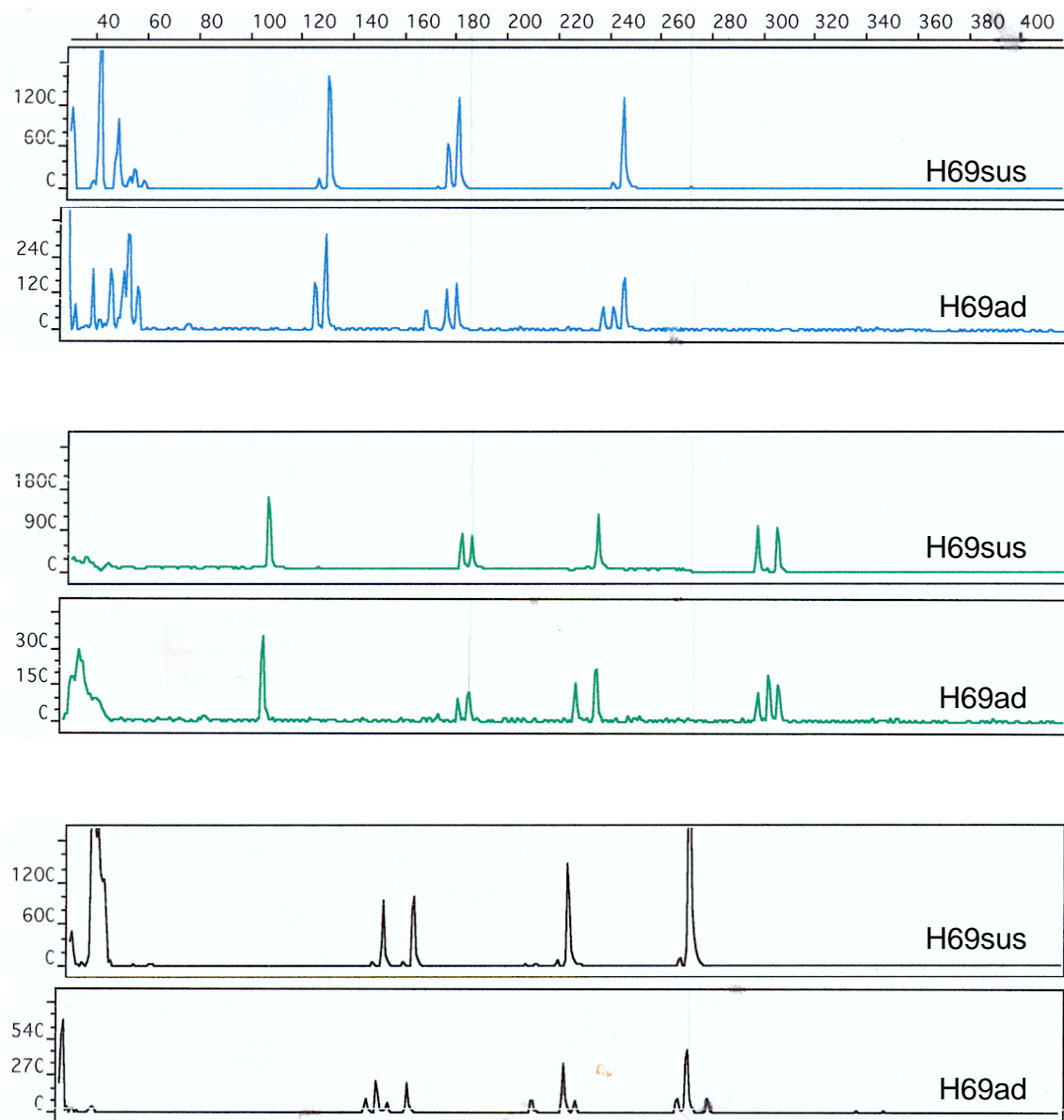


Abb. 3-4: Mittels GeneScanner ausgewertete Mikrosatelliten-Analyse für H69sus und H69ad. Pro Zelllinie wurden 10 Marker amplifiziert, die in je drei Bahnen zusammengefaßt wurden. Zu beachten sind die korrespondierenden X-Achsen-Positionen der Spitzen für die beiden Zelllinien.

Die 10 verschiedenen Loci wurden in je drei horizontale Bahnen zusammengefaßt. Genetische Identität drückt sich durch die gleiche Größe (Basenzahl) der amplifizierten Fragmente aus. Die Größe (Basenzahl) wird ausgedrückt durch die Position auf der X-Achse der Bahnen. Zu beurteilen ist also, ob die Positionen der Spitzen der Bahn 1 (H69sus) an gleicher X-Achsen-Position wie die Spitzen in Bahn 2 (H69ad) sind. Dementsprechend werden die Bahnen 3 und 4, sowie die Bahnen 5 und 6 miteinander

verglichen. Zu beachten ist auch die Skalierung der Y-Achse. Bei H69ad (Bahn 2,4,6) ist die Höhe der Spitzen insgesamt kleiner, da vermutlich weniger DNA für die PCR eingesetzt worden ist.

Man erkennt, daß die Positionen der Spitzen für H69sus und H69ad auf den jeweiligen zusammengehörigen X-Achsen gleich sind, so daß die Zelllinien also genetisch identisch sind.

3.3. Die Genexpression der Zelllinien

Diese Versuche sind von Frau Ines Ferber durchgeführt worden und bilden einen Teil ihrer Promotionsarbeit. Zur Untersuchung der Genexpression der drei Zelllinien-Pärchen H69sus/H69ad, N592sus/N592ad und H82sus/H82ad wurde mRNA isoliert und revers transkribiert. Für bestimmte, besonders interessante Gene wurden spezifische Primer hergestellt, die optimalen Bedingungen für eine semiquantitative PCR herausgearbeitet und die Expression dieser Gene in den Zelllinien ermittelt. Wie sich zeigte, unterschieden sich die genetisch identischen adhärennten Subklone in der Expression bestimmter Gene deutlich von ihren Suspensions-Ausgangszelllinien.

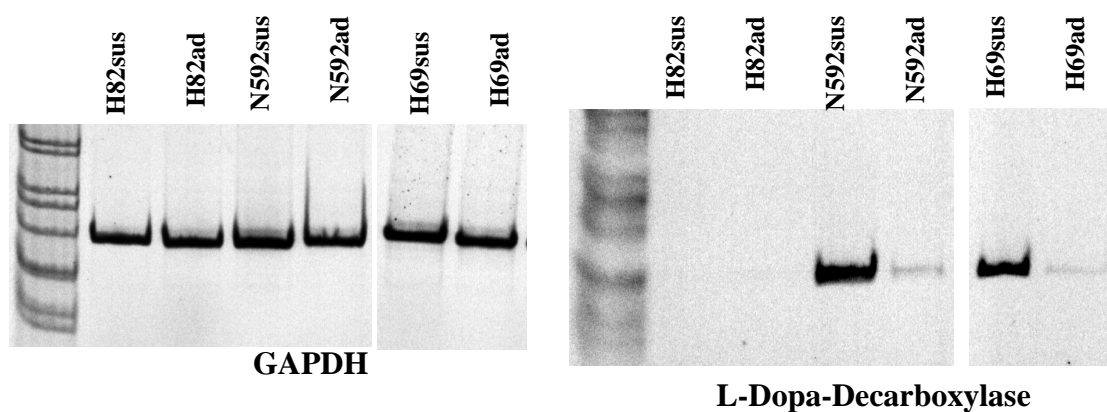


Abb. 3-5: Beispiel einer semiquantitativen RT-PCR nach erfolgter 8% Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Links das housekeeping-Gen GAPDH zur Abschätzung der cDNA-Qualität, in allen Zelllinien etwa gleich stark exprimiert. Rechts der differentiell exprimierte neuroendokrine Marker L-Dopa-Decarboxylase, man beachte den Verlust der Expression in N592ad und H69ad

Nach dem Screening auf Expression von circa 70 verschiedenen Genen ergab sich eine Reihe von Genen, die nur in der Suspensionslinie oder nur in der adhärennten Linie exprimiert wurden. Für eine Zusammenfassung dieser differentiell exprimierten Gene siehe Tabelle 3-1.

| Gen | Charakterisierung | H69sus c-SCLC | H69ad | N592sus c-SCLC | N592ad | H82sus v-SCLC | H82ad |
|---------------------------|--------------------------------------|------------------|-------|-------------------|--------|------------------|-------|
| L-Dopa-Decarboxylase | Neuroendokriner Marker | +++ | - | +++ | - | - | - |
| Neuronspezifische Enolase | Neuroendokriner Marker | +++ | + | +++ | + | ++ | ++ |
| Chromogranin A | Neuroendokriner Marker | +++ | - | ++ | + | +++ | + |
| Gastrin-releasing peptide | Neuroendokriner Marker | ++ | - | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| Integrin beta 1 | Adhärenz | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| Integrin alpha 2 | Adhärenz | - | +++ | - | ++ | - | - |
| Integrin alpha 3 | Adhärenz | + | +++ | ++ | +++ | - | +++ |
| Integrin beta 4 | Adhärenz | - | + | - | +++ | - | - |
| E-Cadherin | Adhärenz | ++ | + | +++ | - | - | + |
| CD44 | Adhärenz/Invasion | ++ | +++ | + | +++ | + | +++ |
| Axl | Adhärenz | - | +++ | - | +++ | - | +++ |
| Cyclin D1 | Zellzyklus | + | +++ | - | +++ | - | + |
| Thrombospondin | Angiogenese | - | +++ | ++ | ++ | + | +++ |
| Endothelin | Angiogenese | - | +++ | - | + | - | + |
| CC3 | Invasionsinhibitor proapoptotisch | +++ | +++ | +++ | ++ | - | - |

Tab. 3-1: Differentiell exprimierte Gene der Zelllinien H69sus/H69ad, N592sus/N592ad und H82sus/H82ad. Zu vergleichen ist jeweils die Genexpression der in Suspension wachsende Ausgangszelllinie mit der ihres adhärennten Subklones. c-SCLC=klassisches SCLC; v-SCLC= variantes SCLC; n.d.=nicht durchgeführt

Interessanterweise gehören die neuroendokrinen Marker (NEM) zu den differentiell exprimierten Genen. Wie in Kapitel 1.1.2 dargestellt, ist die Expression der NEM typisch für das klassische SCLC. Der Verlust von NEM findet sich dagegen in varianten SCLC (siehe Kapitel 1.1.3). H82sus ist in der Literatur als variantes SCLC beschrieben. Die klassischen SCLC-Zelllinien N592sus und H69sus exprimieren dementsprechend die NEM L-Dopa-Decarboxylase, Neuronspezifische Enolase (NSE), Chromogranin A und Gastrin releasing peptide. Die zugehörigen adhärennten Subklone N592ad und H69ad dagegen verlieren die Expression dieser Marker. Interessanterweise exprimiert die als variant beschriebene H82sus NSE und Chromogranin A.

Desweiteren sind einige Gene differentiell exprimiert, welche in der Adhärenz-Ausbildung bedeutsam sind. Die $\alpha 2$ - und $\beta 4$ -Integrine sind in den Linien N592ad und H69ad hochreguliert, das $\alpha 3$ -Integrin zusätzlich auch in H82ad. Ebenso exprimieren alle drei adhärennten Linien die Rezeptortyrosinkinase Axl, im Gegensatz zu den Suspensions-Ausgangslinien.

Die Expression von CyclinD1, einem Gen, welches für ein Zellzyklusprotein kodiert, ist in N592ad und H69ad hochreguliert. Die u. a. für Proteine der Angiogenese kodierenden Gene Thrombospondin und Endothelin sind in allen drei adhärennten Klonen verstärkt exprimiert. CC3, ein proapoptotischer Invasionsinhibitor, ist in H82sus und H82ad, im Gegensatz zu den anderen Zelllinien, nicht exprimiert.

3.4. Das Chemoresistenzverhalten der Zelllinien

Auf Grund der veränderten Morphologie und der verschiedenartigen Genexpression der kultivierten adhärennten Subklone H69ad, N592ad und H82ad interessierte die Fragestellung, ob es auch Differenzen in der Sensitivitäts- bzw. Resistenzlage gegenüber Zytostatika zwischen den adhärennten Subklonen und ihren Suspensions-Ausgangszelllinien gab. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden die Zellen vier Tage lang mit zehn verschiedenen Konzentrationen Etoposid (VP16), Cyclophosphamid, Taxol (Paclitaxel) oder Doxorubicin (Adriamycin) behandelt. Die in Gegenwart und Abwesenheit des jeweiligen Zytostatikums ermittelten Zellzahlen sind in Abb. 3-6 bis Abb. 3-9 jeweils graphisch dargestellt. Vergleichend ist die Wachstumskurve für die NSCLC-Zelllinie LCLC-103H, einem großzelligen Karzinom, dargestellt. Die NSCLC-Linien gelten als primär stärker chemoresistent als die SCLC-Zelllinien. Desweiteren wurden die IC50-Werte ermittelt. Diese stellen die Konzentrationen der verschiedenen Zytostatika dar, bei der es genau zu einer Reduktion der Zellzahl um 50% im Verhältnis zur Zellzahl der unbehandelten Kontrolle kommt. Die dargestellten Ergebnisse sind das Ergebnis von mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

3.4.1. Etoposid (VP16)

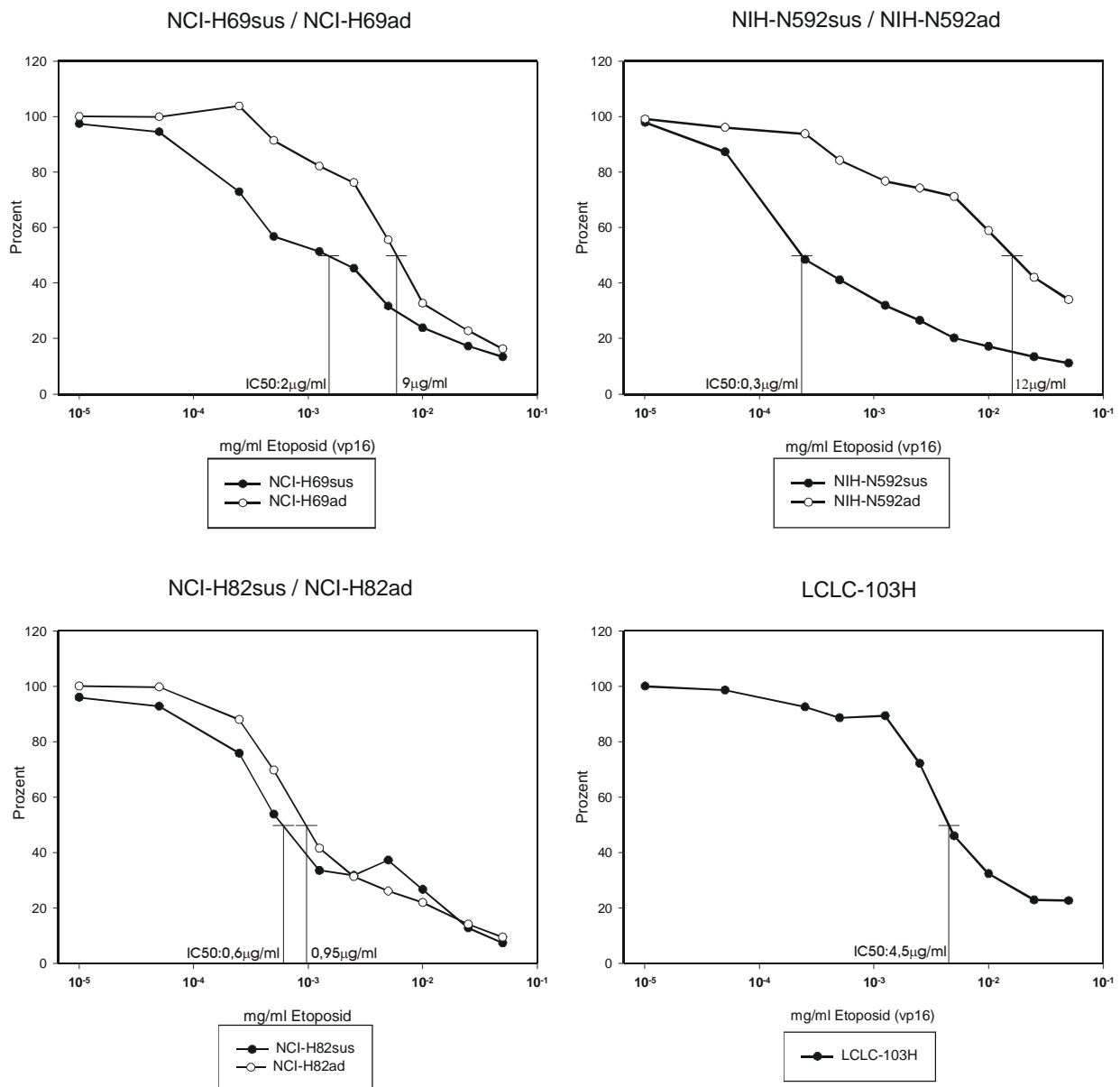


Abb. 3-6: Je Graph dargestellt sind Suspensionsausgangszelllinie mit adhärentem Subklon. Rechts unten die NSCLC-Linie LCLC-103H. Die IC₅₀-Werte geben die Etoposid-Konzentrationen an, bei denen die Zellzahl genau der Hälfte der unbehandelten Kontrolle entspricht.

Zur Beurteilung der Ergebnisse betrachte man in erster Linie die Rechtsverschiebung der Kurven zueinander, also zu Werten höherer Zytostatika-Konzentration hin. Am ausgeprägtesten ist dies bei N592ad im Vergleich zu N592sus zu beobachten, etwas weniger stark bei H69ad zu H69sus und kaum zwischen H82ad und H82sus. N592ad und H69ad sind also deutlich chemoresistenter als ihre Suspensions-Ausgangszelllinien. Betrachtet man

die IC₅₀-Werte, so wird deutlich, daß die Linien N592ad (12µg/ml) und H69ad (9µg/ml) sogar resistenter als die NSCLC-Linie 103H (4,5µg/ml) sind.

3.4.2. Cyclophosphamid

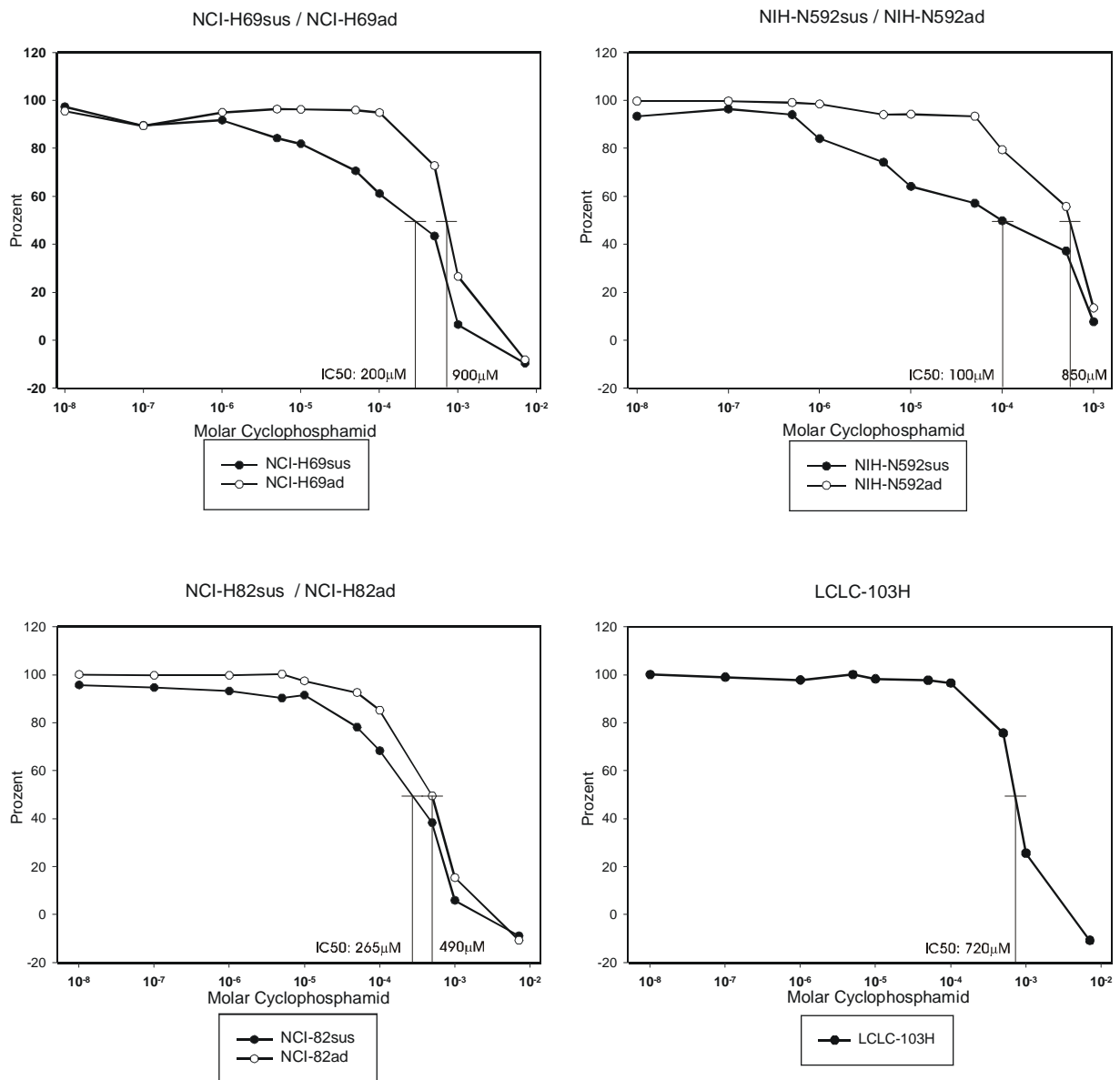


Abb. 3-7: Je Graph dargestellt sind Suspensionsausgangszelllinie mit adhärentem Subklon. Rechts unten die NSCLC-Linie LCLC-103H. Die IC₅₀-Werte geben die Cyclophosphamid-Konzentrationen an, bei denen die Zellzahl genau der Hälfte der unbehandelten Kontrolle entspricht.

Die Ergebnisse für die Behandlung der Zellen mit Cyclophosphamid ist von der Tendenz ähnlich wie die für Etoposid. N592ad ist resistenter gegenüber diesem Zytostatikum als

N592sus, was an der Rechtsverschiebung der Kurve von N592ad zu sehen ist. Ähnliches gilt für H69ad im Vergleich zu H69sus, jedoch weniger stark ausgeprägt. N592ad und H69ad sind also wiederum resistenter als ihre Suspensions-Ausgangszelllinien. Zwischen H82sus und H82ad sieht man eher geringe Differenzen. Auch hier zeigen sich N592ad (IC₅₀: 850µM) und H69ad (IC₅₀: 900µM) sogar resistenter als die NSCLC-Linie 103H (IC₅₀: 720µM).

3.4.3. Doxorubicin (Adriamycin)

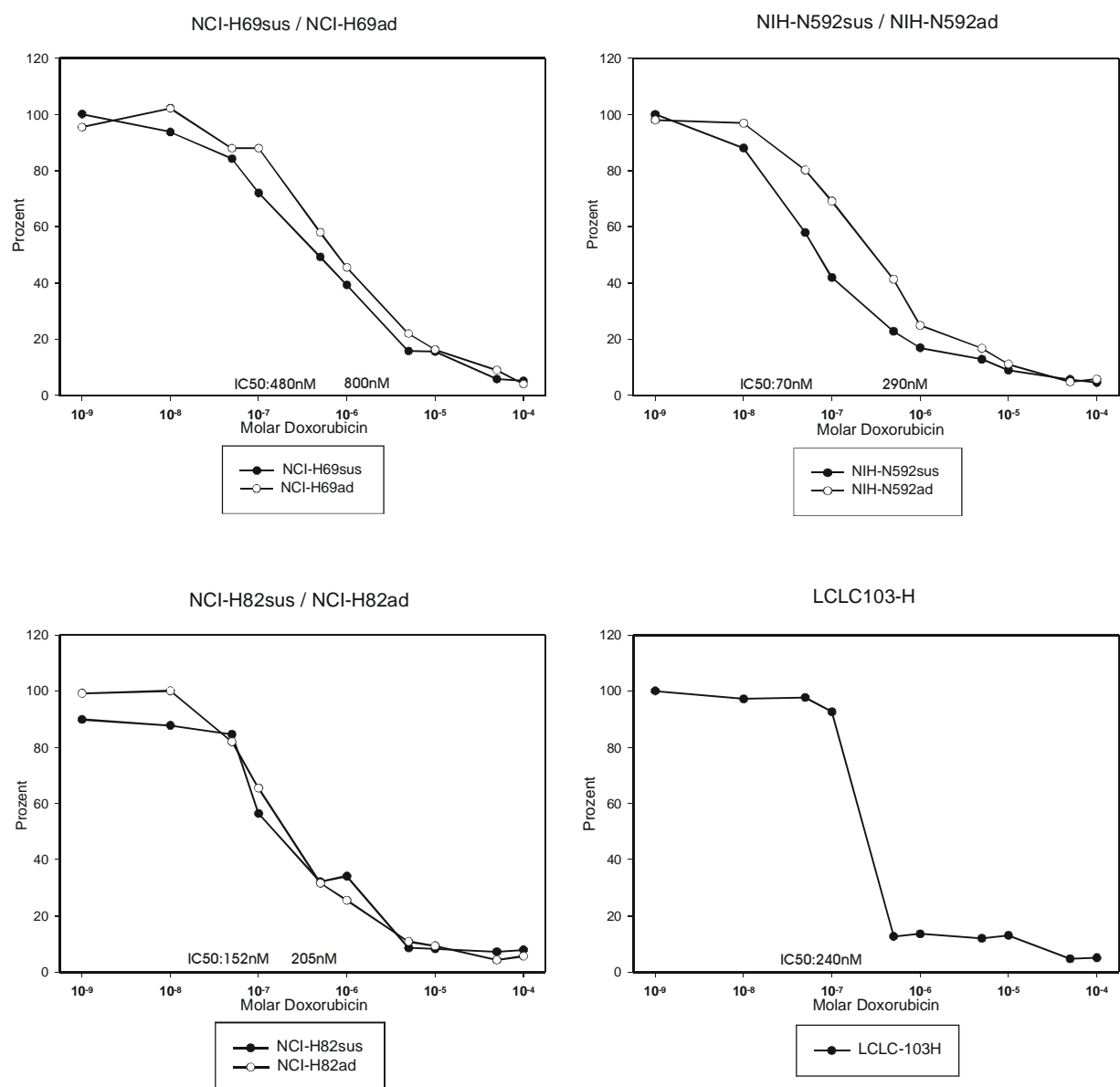


Abb. 3-8: Je Graph dargestellt sind Suspensionsausgangszelllinie mit adhärenem Subklon. Rechts unten die NSCLC-Linie LCLC-103H. Die IC₅₀-Werte geben die Doxorubicin-Konzentrationen an, bei denen die Zellzahl genau der Hälfte der unbehandelten Kontrolle entspricht.

Für Doxorubicin zeigt sich nur bei N592ad/N592sus eine mäßige Differenz im Sinne einer Rechtsverschiebung der Kurve von N592ad zu höheren Doxorubicin-Konzentrationen hin, was einer erhöhten Resistenz von N592ad entspricht. Für H69sus/H69ad, genauso wie für H82sus/H82ad gibt es kaum Unterschiede in der Resistenzlage. Betrachtet man die IC₅₀-Werte, fallen insgesamt hohe Werte für H69 (H69sus: 480nM; H69ad: 800nM) im Vergleich zu 103H (240nM) auf. Ebenfalls resistenter ist die Linie N592ad (290nM).

3.4.4. Paclitaxel (Taxol)

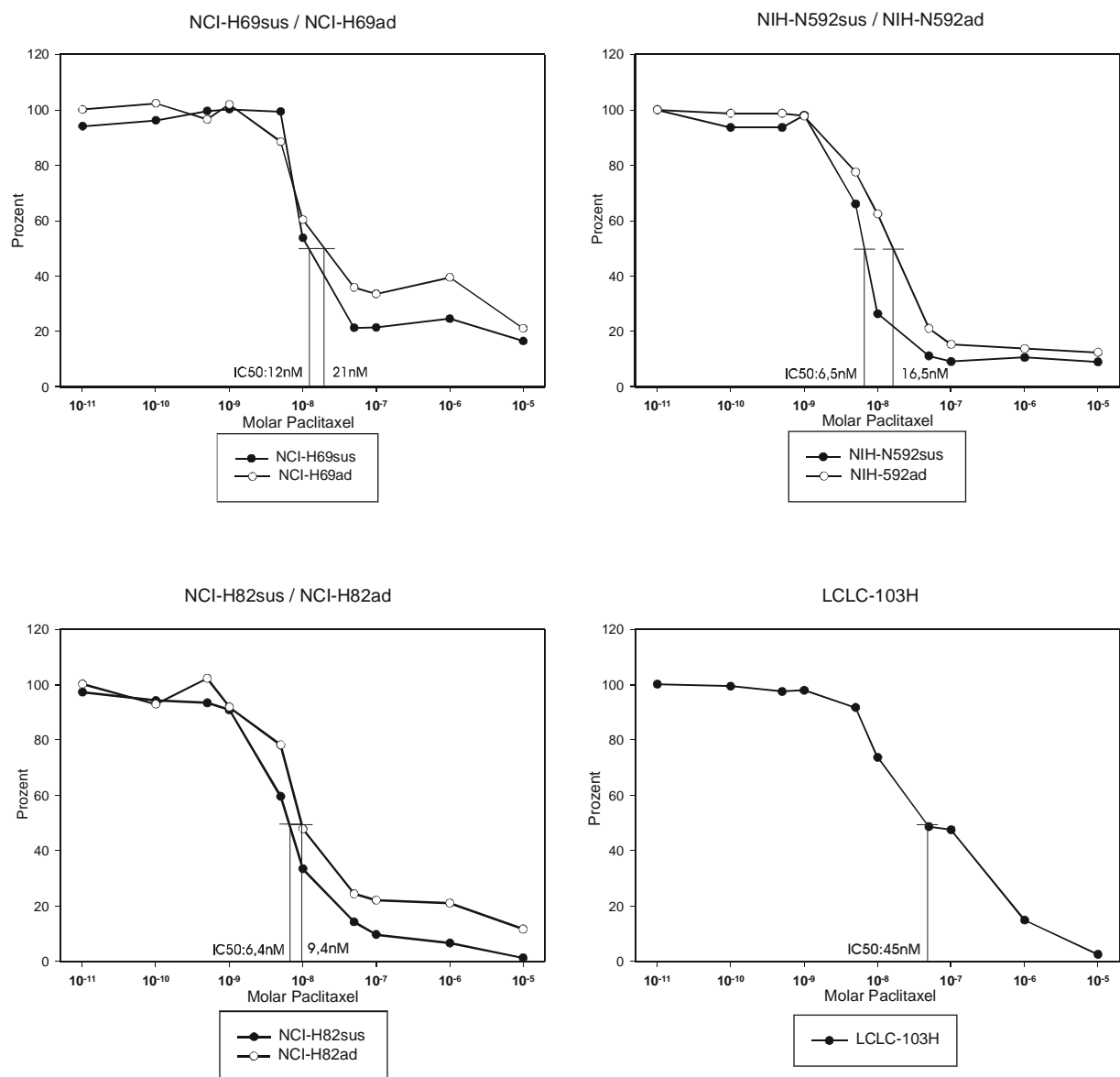


Abb. 3-9: Je Graph dargestellt sind Suspensionsausgangszelllinie mit adhärentem Subklon. Rechts unten die NSCLC-Linie LCLC-103H. Die IC₅₀-Werte geben die Taxol-Konzentrationen an, bei denen die Zellzahl genau der Hälfte der unbehandelten Kontrolle entspricht.

Auf die Behandlung mit Taxol zeigt sich bei den drei kleinzelligen Zelllinienpaaren kaum ein Unterschied in der Chemoresistenz. Allenfalls eine partielle Resistenz der Zelllinie N592ad gegen ihre Suspensions-Ausgangszelllinie lässt sich ausmachen. Bei H69sus/H69ad sowie bei H82sus/H82ad zeigt sich gleiche Sensitivität. 103H, die nichtkleinzellige Kontrolle, ist die insgesamt resistanteste Zelllinie mit einem IC50-Wert von 45nM im Vergleich zu N592ad (16,5nM) und H69ad (21nM).

3.4.5. Zusammenfassung der Chemoresistenz-Ergebnisse

| | H69sus | H69ad | Faktor | Beurteilung |
|--------------|--------|--------|--------|---------------------------------------------------------------------------|
| Etoposid | 2µg/ml | 9µg/ml | x4,5 | Resistenz des ad-Subklons im Vergleich zur sus-Ausgangszelllinie |
| Cyclophosph. | 200µM | 900µM | x4,5 | Resistenz des ad-Subklons im Vergleich zur sus-Ausgangszelllinie |
| Doxorubicin | 480nM | 800nM | x1,7 | kein deutlicher Unterschied zwischen sus-Ausgangszelllinie und ad-Subklon |
| Taxol | 12nM | 21nM | x1,8 | kein deutlicher Unterschied zwischen sus-Ausgangszelllinie und ad-Subklon |

Tab. 3-2: IC50-Werte für den Vergleich H69sus/H69ad und Beurteilung der Sensitivität/Resistenz

| | N592sus | N592ad | Faktor | Beurteilung |
|--------------|----------|---------|--------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Etoposid | 0,3µg/ml | 12µg/ml | x40 | deutliche Resistenz des ad-Subklons im Vergleich zur sus-Ausgangszelllinie |
| Cyclophosph. | 100µM | 850µM | x8,5 | deutliche Resistenz des ad-Subklons im Vergleich zur sus-Ausgangszelllinie |
| Doxorubicin | 70nM | 290nM | x4,1 | Resistenz des ad-Subklons im Vergleich zur sus-Ausgangszelllinie |
| Taxol | 6,5nM | 16,5nM | x2,5 | kein deutlicher Unterschied zwischen sus-Ausgangszelllinie und ad-Subklon |

Tab. 3-3: IC50-Werte für den Vergleich N592sus/N592ad und Beurteilung der Sensitivität/Resistenz

| | N82sus | N82ad | Faktor | Beurteilung |
|--------------|----------|----------|--------|---------------------------------------------------------------------------|
| Etoposid | 0,6µg/ml | 0,9µg/ml | x1,5 | kein deutlicher Unterschied zwischen sus-Ausgangszelllinie und ad-Subklon |
| Cyclophosph. | 265µM | 490µM | x1,8 | kein deutlicher Unterschied zwischen sus-Ausgangszelllinie und ad-Subklon |
| Doxorubicin | 152nM | 205nM | x1,4 | kein deutlicher Unterschied zwischen sus-Ausgangszelllinie und ad-Subklon |
| Taxol | 6,4nM | 9,5nM | x1,5 | kein deutlicher Unterschied zwischen sus-Ausgangszelllinie und ad-Subklon |

Tab. 3-4: IC50-Werte für den Vergleich H82sus/H82ad und Beurteilung der Sensitivität/ Resistenz

| | 103H |
|-----------------|----------|
| Etoposid | 4,5µg/ml |
| Cyclophosphamid | 720µM |
| Doxorubicin | 240nM |
| Taxol | 45nM |

Tab. 3-5: IC50-Werte der Zelllinie 103H

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß sich die adhärent kultivierten N592ad Zellen bei drei von vier getesteten Zytostatika eine Resistenz im Vergleich zu der in Suspension kultivierten Ausgangszelllinie N592sus erworben haben. Die IC50-Werte von N592ad sind in diesen drei Fällen auch im Vergleich zur mitgeführten NSCLC-Linie, welche einen primär resistenteren Bronchialkarzinomtyp repräsentiert, höher.

H69ad zeigt bei zwei von vier getesteten Zytostatika eine erhöhte Resistenz gegenüber H69sus und die IC50-Werte sind in drei von vier Fällen höher als die der Linie 103H

Zwischen H82sus und H82ad zeigen sich keine nennenswerten Differenzen in der Resistenzlage gegenüber Zytostatika-Behandlung.

3.5. Das Radioresistenzverhalten der Zelllinien

Genauso wie die Daten zur Resistenz der Zellen gegenüber Zytostatika war die Resistenz der Zelllinien gegenüber ionisierender Strahlung von Interesse. Um diese zu ermitteln, wurden die Zellen einer Gamma-Bestrahlung der Stärke 2 Gy und 8 Gy ausgesetzt. An drei aufeinanderfolgenden Tagen wurde die Zellzahl bestimmt und ins Verhältnis einer mitgeführten unbestrahlten Kontrolle gesetzt. Die ermittelten Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, dargestellt ist das Ergebnis für die kleinzelligen Zelllinien-Pärchen H69sus/H69ad, N592sus/N592ad und H82sus/H82ad sowie die nichtkleinzellige Linie 103H drei Tage nach Bestrahlung.

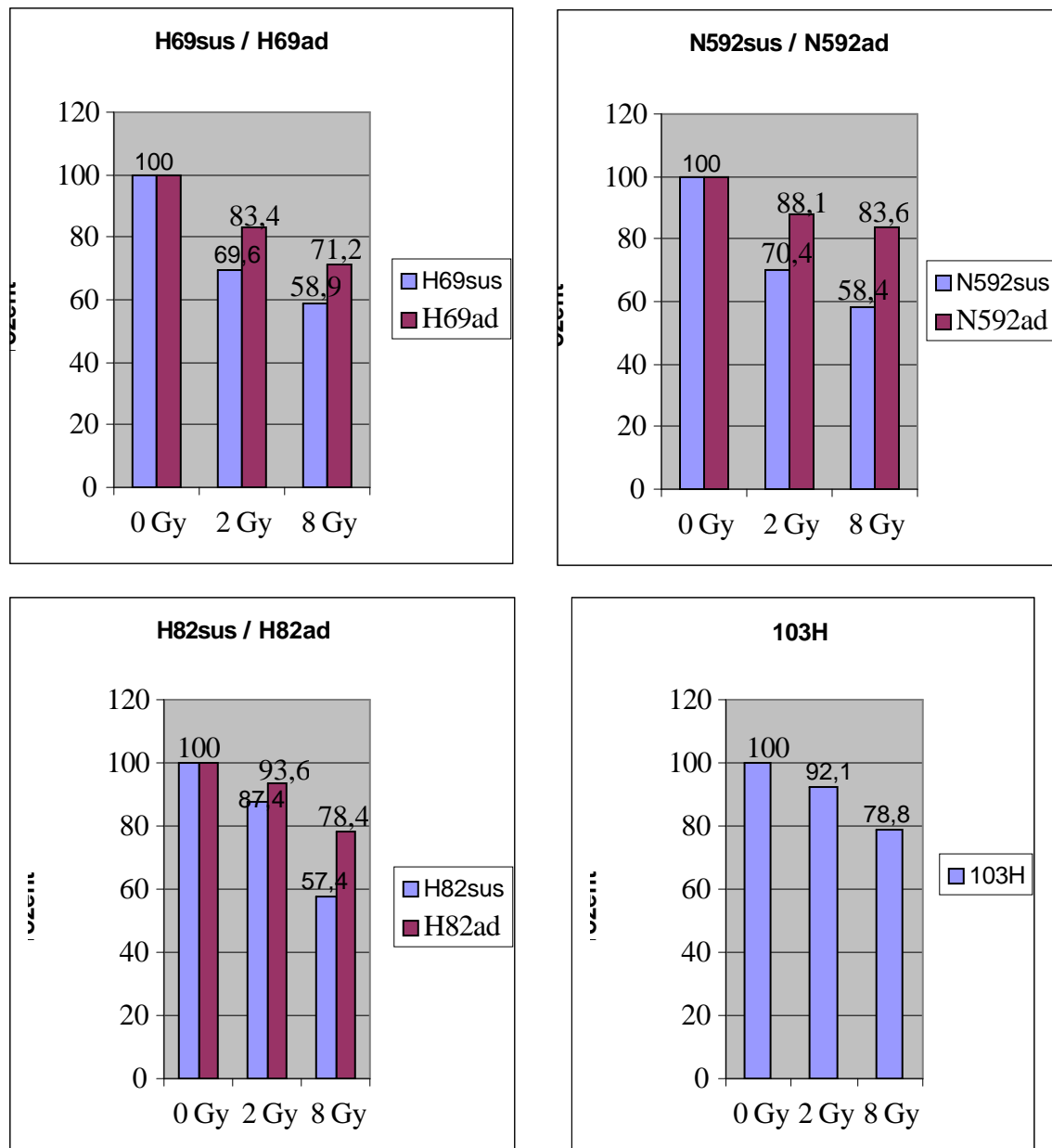


Abb. 3-10: Die Zelllinien 3 Tage nach Bestrahlung mit Gamma-Strahlung der Stärke 0 Gy, 2 Gy und 8 Gy. Dargestellt ist die Zellzahl der bestrahlten Zellen (2 Gy und 8 Gy) in Prozent der mitgeführten unbestrahlten Zellen (0 Gy).

Bei Betrachtung der ermittelten Daten fällt auf, daß alle drei adhärennten Subklone prozentual mehr überlebende Zellen aufweisen als ihre Suspensions-Ausgangszelllinien und somit resistenter gegenüber Gamma-Strahlung sind.

Am ausgeprägtesten ist die Differenz zwischen N592sus und N592ad. Drei Tage nach Bestrahlung der Stärke 2 Gy beträgt die Population der Suspensions-Zelllinie 70% der

unbestrahlten Kontrolle, die Population der adhärenenten Linie dagegen 88%. Bei Bestrahlung mit 8 Gy ist N592sus bei 58%, N592ad bei 83% der unbestrahlten Kontrolle. Weniger ausgeprägt, aber mit der gleichen Tendenz gilt dies für H69sus/H69ad und H82sus/H82ad. Die nichtkleinzellige Linie H103 zeigt das weitestgehende Resistenzverhalten, das demjenigen einer NSCLC-Linie entspricht.

Abb. 3-11 zeigt die Entwicklung der Zellzahl im Verlauf von drei Tagen nach Bestrahlung.

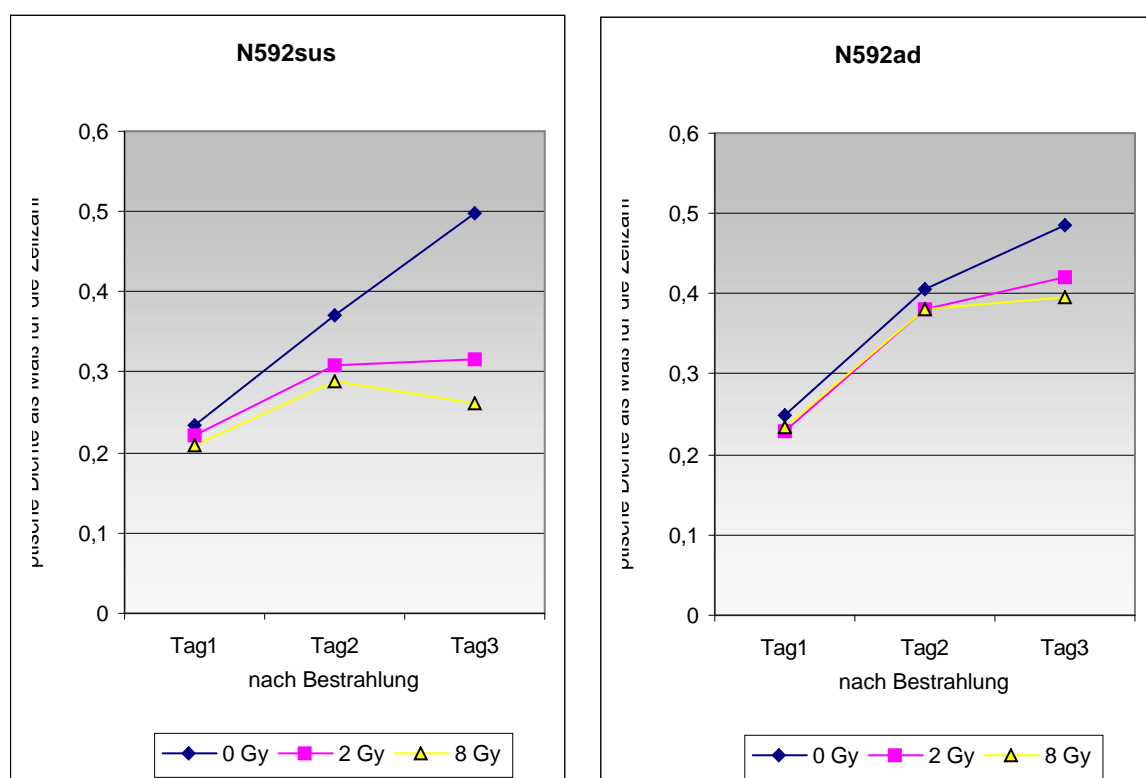


Abb. 3-11: : Entwicklung der Zellzahl von N592sus (links) und N592ad (rechts) über 3 Tage nach Bestrahlung mit 0 Gy, 2 Gy und 8 Gy sowie unbestrahlt. Die Zellzahl wurde mittels eines Proliferationsassays photometrisch als optische Dichte ermittelt, siehe hierzu Kapitel 2.2.3

Anhand dieses Beispiels für die Zelllinie N592 lässt sich zeigen, wie sich die Zellzahl an den auf die Bestrahlung folgenden Tagen entwickelt. Die Proliferationsgeschwindigkeit der mit 2 Gy und 8 Gy bestrahlten Zellen, abzulesen jeweils an der Steigung des Graphen, ist bei den adhärenenten Zellen annähernd so schnell wie die der unbestrahlte Kontrolle. Der Effekt der Bestrahlung ist relativ gesehen gering. Bei den Suspensionszellen verlief der Graph für

die mit 2 Gy und 8 Gy bestrahlten Zellen flacher, was einer stärker ausgeprägten Wirkung der ionisierenden Strahlung entspricht.

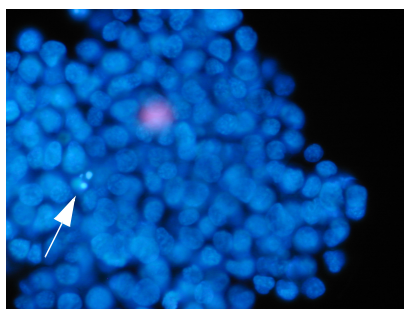
Zusammengefasst zeigen alle drei adhärenen Subklone eine deutlich erhöhte Resistenz gegenüber Gamma-Strahlen, am deutlichsten zu sehen bei N592ad im Vergleich zu N592sus.

3.6. Gamma-Strahlen induzierte Apoptoseinduktion

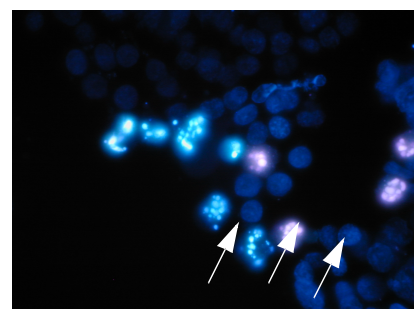
Zytostatika und Strahlung üben den Hauptteil ihrer Wirkung über eine Induktion des Apoptoseprogramms aus (siehe Einleitung). Daher war es von Interesse zu untersuchen, ob die gefundene Resistenz bei N592ad und H69ad gegenüber Zytostatika und Gamma-Strahlung sich in einer vermehrten Apoptose-Resistenz auswirkt. Deshalb wurden Versuche durchgeführt, die es ermöglichten, Apoptose direkt nachzuweisen und zu quantifizieren.

3.6.1. Hoechst 33342/ Propidiumiodid-Färbung

Die Zelllinien wurden mit Gamma-Strahlen der Stärke 2 Gy und 8 Gy behandelt. Drei Tage nach Bestrahlung wurden die Zellen geerntet, mit der Hoechst 33342/Propidiumiodid-Färbelösung gefärbt und sofort unter dem Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet.



N592sus bei 0 GY



N592sus bei 2 GY

Abb. 3-12: Die Zelllinie N592sus Hoechst 33342/Propidiumiodid gefärbt, drei Tage nach Bestrahlung mit Gamma-Strahlen. Die weißen Pfeile indizieren apoptotische Zellen. Erklärungen zur Färbung siehe Text.

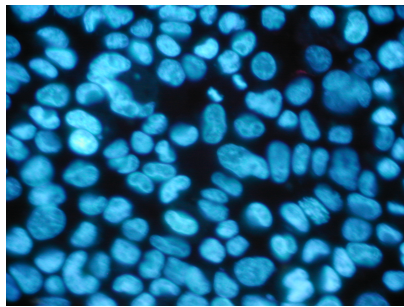
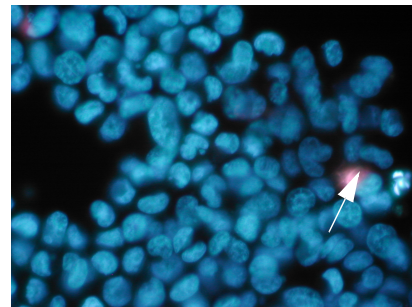
*N592ad bei 0 GY**N592ad bei 2 GY*

Abb. 3-13: Die Zelllinie N592ad Hoechst 33342/Propidiumiodid gefärbt, drei Tage nach Bestrahlung mit Gamma-Strahlen. Die weißen Pfeile indizieren apoptotische Zellen. Erklärungen zur Färbung siehe Text.

Der Hoechst 33342-Farbstoff (hellblau) kann Membranen durchdringen, lagert sich in die DNA ein und färbt die Zellkerne vitaler wie avitaler Zellen. Propidiumiodid gelangt nur in Zellen, deren Membranen nicht mehr intakt sind, färbt also nur die Zellkerne avitaler Zellen. Apoptotische Zellkerne werden anhand ihrer typischen Morphologie, nämlich anhand der Fragmentierung und Kondensierung des Chromatins (Wyllie et al. 1980), erkannt. Der apoptotische Zellkern sieht demnach hellblau Hoechst 33342 gefärbt, geschrumpft und durch das kondensierte und fragmentierte Chromatin gepunktelt aus (siehe Abb. 3-12 und 3-13). Er kann auch eine rosa Farbe annehmen, wenn die Membran im späteren Apoptoseprozeß für Propidiumiodid durchlässig wird. Der normale Zellkern dagegen ist normalgroß, hellblau und nicht kondensiert; nekrotische Zellkerne erscheinen geschwollen, vergrößert und rosarot Propidiumiodid-gefärbt.

Zur Quantifizierung wurden in mehrere Gesichtsfeldern pro Bedingung im Fluoreszenz-Mikroskop die normalen und die apoptotischen Zellen gezählt. Die so ermittelten Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

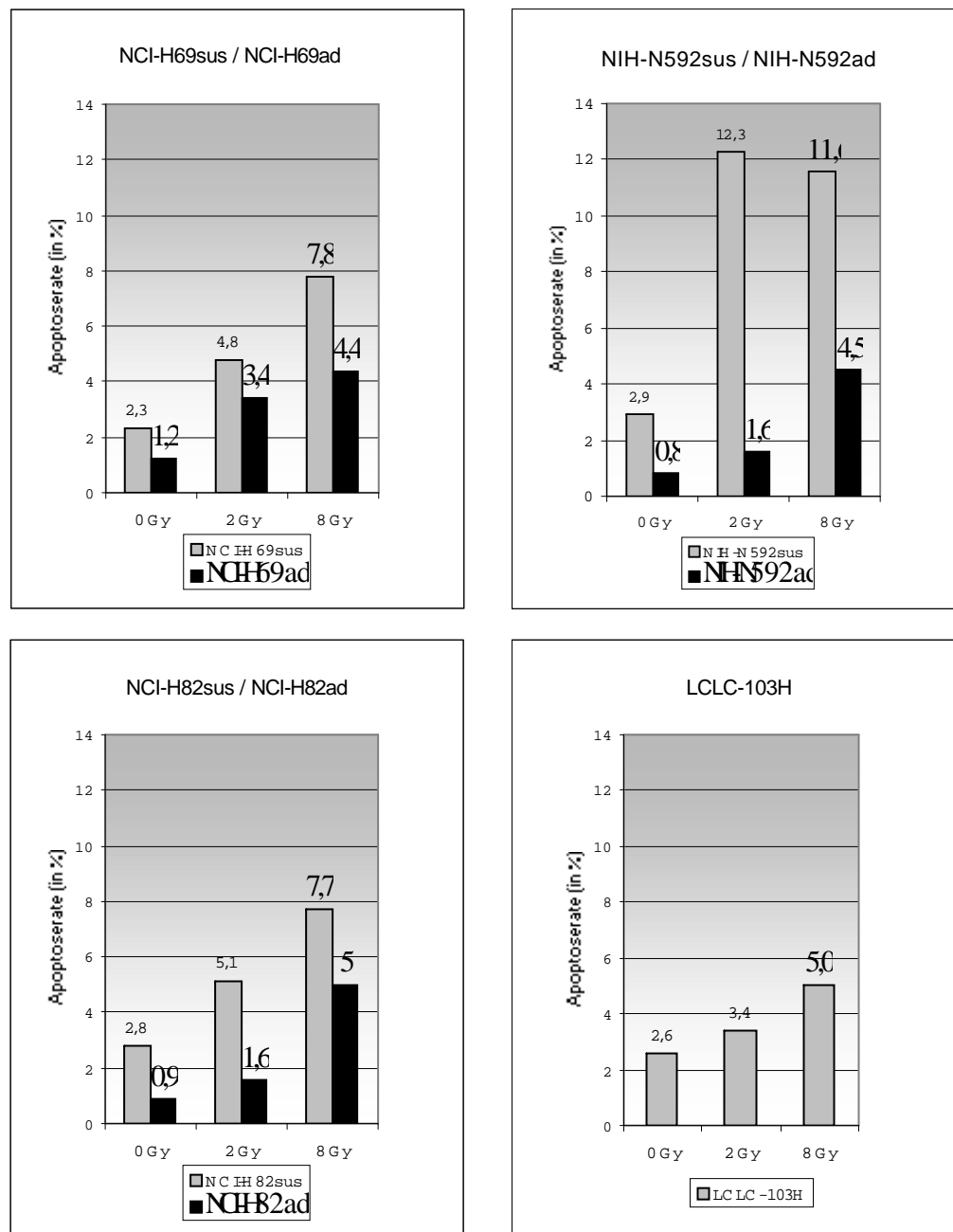


Abb. 3-14: zeigt die Fraktion der apoptotischen Zellen unbestrahlt und 3 Tage nach Bestrahlung mit 2 Gy und 8 Gy

Die gefundenen Apoptoseraten korrelieren gut mit den erhobenen Proliferationsdaten nach Bestrahlung. Betrachtet man die Ergebnisse, fällt sofort auf, daß in allen drei adhärenen Subklonen die Fraktion der apoptotischen Zellen deutlich geringer ist. Exemplarisch seien die Ergebnisse für das Pärchen N592sus/N592ad besprochen, bei der die deutlichsten Unterschiede gesehen werden. Schon die spontane Apoptoserate, also ohne Einwirkung ionisierender Strahlung, ist im adhärenen Subklon mit 0,8% gegenüber 2,9% bei der

Suspensionszelllinie deutlich vermindert. 3 Tage nach Bestrahlung mit 2 Gy bzw. 8 Gy finden sich bei N592ad ausgeprägt weniger apoptotische Zellen im Vergleich zu N592sus, nämlich 1,6% im Vergleich zu 12,3% (2 Gy) bzw. 4,5% im Vergleich zu 11,6% (8 Gy). Von der Tendenz her gleich, aber weniger ausgeprägt präsentieren sich die Zelllinien H69sus/H69ad und H82sus/H82ad. Bei beiden ist in den adhärenenten Subklonen schon die spontane Apoptosefraktion vermindert und auch die Apoptosefraktion bei 2 Gy und bei 8 Gy ist deutlich reduziert. Die apoptotische Fraktion der nichtkleinzelligen Linie 103H zeigt sich mit 2,6% (0 Gy), 3,4% (2 Gy) und 5,0% (8 Gy) etwa in der Größenordnung des adhärenenten kleinzelligen Subklons H69ad und liegt sogar leicht über N592ad.

3.6.2. Caspase-3-Assay

Der Caspase-3-Assay ist eine alternative Methode, die Fraktion der apoptotischen Zellen zu quantifizieren. Die Caspase-3 ist ein Enzym, welches an der Durchführung des Apoptoseprogramms beteiligt ist (siehe Kapitel 1.3). Bei dem Caspase-3-Assay wird die Aktivität der Caspase-3 aus einem Proteinextrakt behandelter Zellen, in diesem Fall 2 Tage nach Bestrahlung mit 2 Gy bzw. 8 Gy, bestimmt. Die Aktivität wird ermittelt, indem ein spezielles Substrat von der aktivierten Caspase-3 gespalten wird und dann photometrisch bestimmt wird. Die ermittelten Absorptionswerte werden durch Verrechnung mit einem Standard in sogenannte Caspase-Einheiten umgerechnet (siehe Kapitel 2.2.4.2).

Der Assay machte dem Anwender mehrere Probleme, die die Interpretation der ermittelten Daten erschwerten. Ein Hauptproblem war, daß, trotz Einsatzes hoher Zellzahlen von 2×10^6 Zellen pro Ansatz, die erhaltenen Absorptionswerte auf einem insgesamt sehr niedrigen Niveau lagen. Sie lagen zwischen 0,07 für den Leerwert gegen den gemessen wurde und 0,2 für die Werte maximaler Caspase-Aktivierung, z.B. in Zellen nach Bestrahlung mit 8 Gy. Ein weiterer Nachteil war, daß die Zellen zum korrekten Einsatz im Assay direkt zu Beginn des Assays, also nach Bestrahlung, in der Neubauerzählkammer gezählt werden mußten. Dies war insbesondere für die Suspensionszelllinien nicht einfach, da die Zellen Konglomerate zu Hunderten von Zellen bildeten (siehe Abb. 3-1 bis Abb. 3-3) und sich selbst durch mehrfaches Aufnehmen und Ablassen in der Pipette nicht gut trennen ließen. So wurde der Assay schließlich zu Gunsten der Hoechst 33342/PI-Färbung verlassen. Die ermittelten Ergebnisse sollen trotzdem hier dargestellt werden (siehe Tabelle 3-6).

| Caspase-3-Units | 0 Gy | 2 Gy | 8 Gy |
|-----------------|------|------|------|
| H69sus | 4,4 | 24,6 | 36,5 |
| H69ad | 4,7 | 7,8 | 68,3 |
| N592sus | 5,8 | 30,3 | 47,7 |
| N592ad | 0 | 20,7 | 42,5 |
| H82sus | 9 | 17,3 | 70 |
| H82ad | 3,4 | -7 | 16,3 |

Tab. 3-6: zeigt die ermittelten Caspase-3-Units

Betrachtet man die ermittelten Caspase-3-Einheiten, stellt man fest, daß die Apoptosefraktion, ausgedrückt in einer verminderten Caspase-3-Aktivität, in den adhärennten Subklonen reduziert ist, mit Ausnahme der Linie H69sus/H69ad bei 8 Gy. Bei 2 Gy ist die Caspase-3-Aktivität in allen drei adhärennten Subklonen deutlich vermindert im Vergleich zur Suspensions-Ausgangslinie, nämlich 7,6 Caspase-3-Einheiten (C3E) im Vergleich zu 24,6 C3E bei H69ad/H69sus; 20,7 C3E im Vergleich zu 30,3 C3E bei N592ad/N592sus und -7 C3E zu 17,3 C3E bei H82ad/H82sus. Die Daten bei 8 Gy zeigen eine hohe Caspase-3-Aktivität in H69ad im Vergleich zu H69sus, eine leicht verminderte Caspase-3-Aktivität bei N592ad zu N592sus und eine deutlich geminderte Caspase-3-Aktivität bei H82ad zu H82sus.

3.7. PKB/Akt-Western-Blots

Diese Versuche sind von Frau Ines Ferber im Labor durchgeführt worden und bilden einen Teil ihrer Promotionsarbeit. Die gefundene Resistenz der adhärennten Subklone gegen Zytostatika, Gamma-Strahlung und Apoptose-Induktion durch Gamma-Strahlung veranlaßte die Untersuchung des PKB/Akt-Signalweges. Zur Herstellung eines Proteinextraktes wurden die Zelllinien für 24 h unter serumfreien Bedingungen kultiviert, um konstitutive Aktivierungen zu finden und nicht Aktivierungen durch die zahlreichen im Serum vorhandenen Wachstumsfaktoren. Der Western-Blot wurde mit einem Phospho-PKB/Akt-spezifischen Antikörper, der spezifisch die phosphorylierte, also aktivierte, Form des Proteins erkennt und einem Gesamt-PKB/Akt-Antikörper, der nicht zwischen phosphoryliert und unphosphoryliert unterscheidet, durchgeführt (siehe Abb. 3-15).

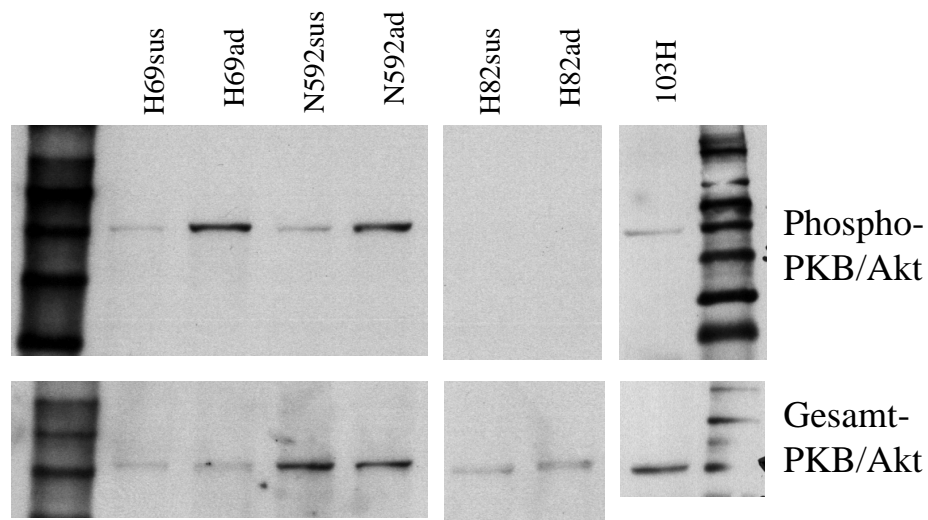


Abb. 3-15: PKB/*Akt*-Western-Blot mit den Zelllinien H69sus/H69ad, N592sus/N592ad, H82sus/H82ad und der nichtkleinzelligen 103H. Oben der Nachweis des phosphorylierten (also aktiven) Proteins, unten der Nachweis des Proteins insgesamt

Bei Betrachtung der Banden des Phospho-PKB/Akt Blots fällt eine konstitutive Aktivierung von PKB/Akt in den adhärenen Subklonen H69ad und N592ad auf. Die Suspensions-Ausgangszelllinien H69sus und N592sus zeigen dagegen keine Aktivierung, und ebensowenig die Zelllinien H82sus, H82ad und die nichtkleinzellige 103H. Im Gesamt-PKB/Akt-Blot zeigen sich keine Unterschiede im Vergleich zwischen Suspensions- und adhärenen Zelllinien.

Um die Zusammenhänge zwischen Adhärenz und PKB/Akt-Aktivierung in den Zelllinien H69ad und N592ad weiter zu erhellen, wurde die Beobachtung ausgenutzt, daß die adhärenen Zellen, wenn man sie auf nicht beschichteten Schalen kultivierte, wieder in ihre Suspensionsform zurückfanden. Diese solchermassen wieder in Suspension wachsenden Zelllinien wurden H69ad reversibel und N592ad reversibel genannt. Von ihnen wurde ein Proteinextrakt für einen Western-Blot hergestellt, der in Abb. 3-16 dargestellt ist.

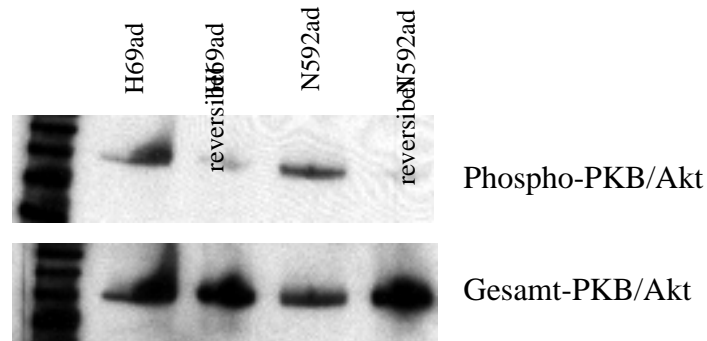


Abb. 3-16: PKB/ Akt-Westernblot nur für die Zelllinien H69ad und N592ad. Im Vergleich die normalen adhärenenten Zelllinien H69ad und N592ad mit den Zelllinien H69ad reversibel und N592ad reversibel, bei denen der adhärenente Phänotyp durch Kultivierung auf nicht beschichteten Kulturschalen aufgehoben wurde und die Zellen zu einem Wachstum in Suspensionsform zurückgekehrt waren.

Bei Betrachtung der Phospho-Akt Banden fällt auf, daß die konstitutiv aktivierte Form von PKB/Akt nur in den adhärenenten Zelllinien H69ad und N592ad zu finden ist, aber nicht mehr in den Zelllinien H69ad reversibel und N592ad reversibel, in denen die Adhärenz durch Kultivierung auf unbeschichteten Platten aufgehoben worden war. Die Adhärenz bedingt also direkt die PKB/Akt-Aktivierung.

3.8. PKB/Akt-Antisense-Oligonukleotide

Die Ergebnisse der bisherigen Versuche ergaben, daß die adhärenenten Zelllinien H69ad und N592ad resistenter gegenüber eingesetzten Zytostatika, Gamma-Strahlung und Apoptoseinduktion durch Gamma-Strahlung sind und in den adhärenenten Klonen H69ad und N592ad PKB/Akt konstitutiv aktiviert ist. Um zu überprüfen, in wieweit ein kausaler Zusammenhang zwischen diesen beiden Beobachtungen existiert, wurden Experimente mit PKB/Akt-Antisense-Oligonukleotiden durchgeführt. Durch diese Massnahme lässt sich idealerweise PKB/Akt spezifisch ausschalten und untersuchen, ob die beobachteten Resistenzen, zum Beispiel gegen Strahlung, reversibel sind.

Die PKB/Akt-Antisense-Oligonukleotide waren so konzipiert, daß sie komplementär zu einem kurzen Teil der PKB/Akt mRNA sind und so die Translation der mRNA in das Protein verhindern. Die Antisense-Oligonukleotide wurden uns freundlicherweise von Frau

Dr. Emily Slater aus dem Institut für Immunologie und Tumorforschung (IMT), Philipps-Universität Marburg, zur Verfügung gestellt.

Die Transfektion der Oligonukleotide wurde in verschiedenen Konzentrationen an zwei aufeinander folgenden Tagen einschließlich einer Missense-Oligonukleotid-Kontrolle durchgeführt. Am dritten Tag wurde dann die eine Hälfte der Zellen für einen Proteinextrakt und einen PKB/Akt-Western-Blot verwendet (Proteinextrakt und Western-Blots durchgeführt von Frau Ines Ferber), die andere Hälfte (einschließlich einer unbestrahlten Kontrolle) mit 2 Gy und 8 Gy bestrahlt und, wie in Kapitel 3.5 beschrieben, drei Tage nach Bestrahlung die Zellzahl ermittelt. Auf Grund des aufwendigen Vorgehens wurden die Versuche separat für die Zelllinien N592sus/N592ad sowie H69sus/H69ad durchgeführt, nicht jedoch für H82sus/H82ad, da diese Linien im PKB/Akt-Western-Blot keine differentielle Aktivierung des Proteins zeigten.

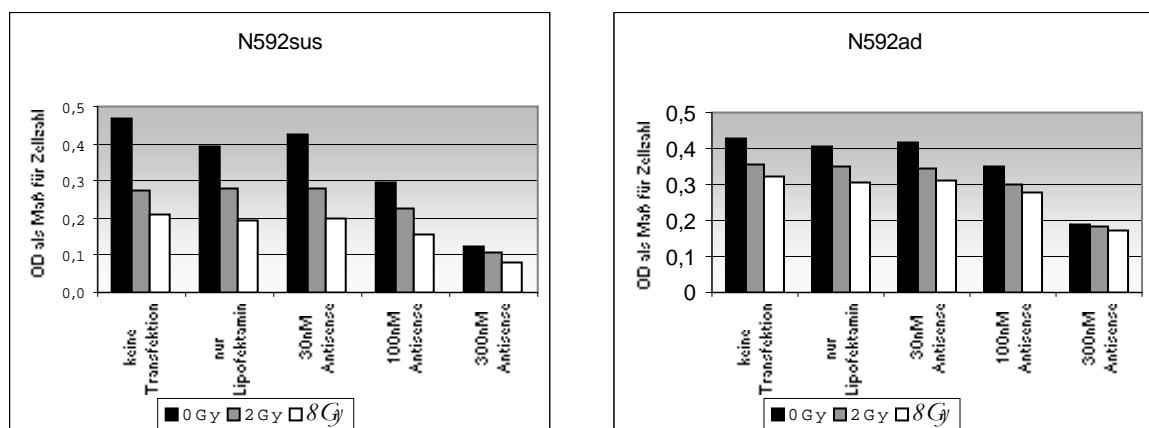


Abb. 3-17: Die optische Dichte als Maß für die Zellzahl 3 Tage nach Bestrahlung der Stärke 2 Gy und 8 Gy sowie unbestrahlt bei der Zelllinie N592sus/N592ad, welche mit verschiedenen Konzentrationen des PKB/Akt-Antisense-Oligonukleotids behandelt worden war.

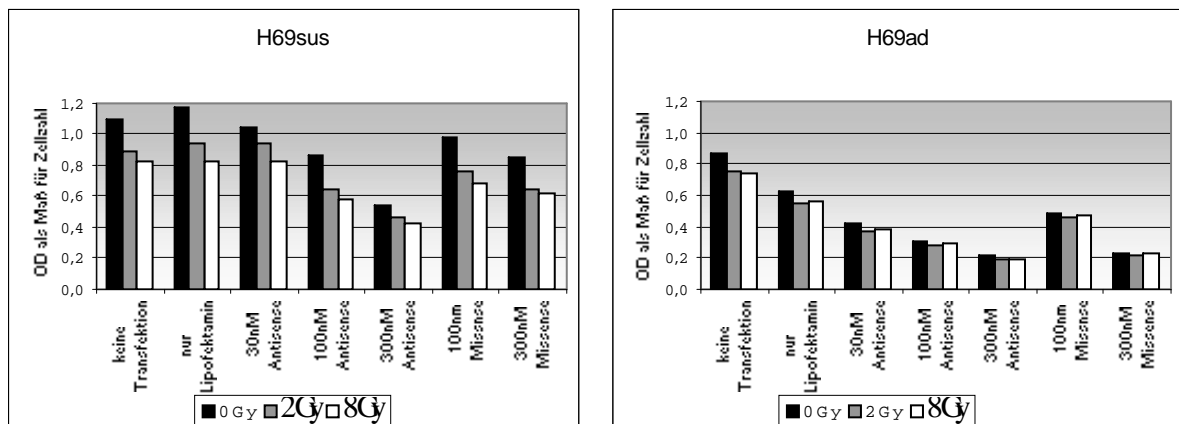


Abb. 3-18: Die optische Dichte als Maß für die Zellzahl 3 Tage nach Bestrahlung der Stärke 2 Gy und 8 Gy sowie unbestrahlt bei der Zelllinie H69sus/H69ad, welche mit verschiedenen Konzentrationen des PKB/Akt-Antisense- sowie des Missense-Oligonukleotids behandelt worden war.

Betrachtet man die Ergebnisse zur Zellzahl der PKB/Akt-Antisense transfizierten Zellen drei Tage nach Bestrahlung, so fällt für die Zelllinie N592sus/N592ad die ausgeprägte Wirkung der Antisense-Oligonukleotide bei 100nM und 300nM schon bei den unbestrahlten Zellen auf. Die optische Dichte beträgt bei Suspensions- und adhärenter Linie bei 300nM Antisense-Oligonukleotid weniger als die Hälfte derjenigen der unbehandelten Zellen. Weiterhin ist zur Kenntnis zu nehmen, daß bei diesen hohen Antisense-Oligonukleotid-Konzentrationen von 100nM und 300nM der zusätzliche Effekt der Bestrahlung mit 2 Gy und 8 Gy kaum eine weitere Reduktion der Zellzahl bewirkt.

Betrachtet man die Ergebnisse für die Zelllinie H69sus/H69ad, die zeitlich später durchgeführt wurden und bei denen ein Missense-Oligonukleotid als Kontrolle mitgeführt wurde, kann man ebenfalls die gleichen oben beschriebenen Effekte beobachten. Zu nennen ist bereits eine Reduktion der unbestrahlten Zellzahl bei hohen Antisense-Oligonukleotid-Konzentrationen ohne zusätzliche Wirkung der Gamma-Strahlung. Zusätzlich scheint auch die Transfektion eines unspezifischen Oligonukleotids (Missense-Oligonukleotid) in höheren Konzentrationen (z.B. 300nM) einen ausgesprochenen inhibitorischen Effekt zu besitzen. Hier muß man eine unspezifisch toxische Wirkung annehmen. Zur Interpretation dieser Ergebnisse siehe Kapitel 4.4.1.

3.9. Zellzyklusanalyse

Um weitere Aufschlüsse über das Proliferationsverhalten der nativen Zellen zu erlangen, wurde eine Zellzyklusanalyse im FACS (*Fluorescence Activated Cell Scanner*) durchgeführt. Dazu wurden fixierte Zellen mit Propidiumiodid (PI) gefärbt, welches sich in die DNA einlagert. Das FACS-Gerät unterscheidet die Zellen anhand der Intensität ihres PI-Signals und ordnet sie so verschiedenen Phasen des Zellzyklus zu (siehe Abb. 3-19).

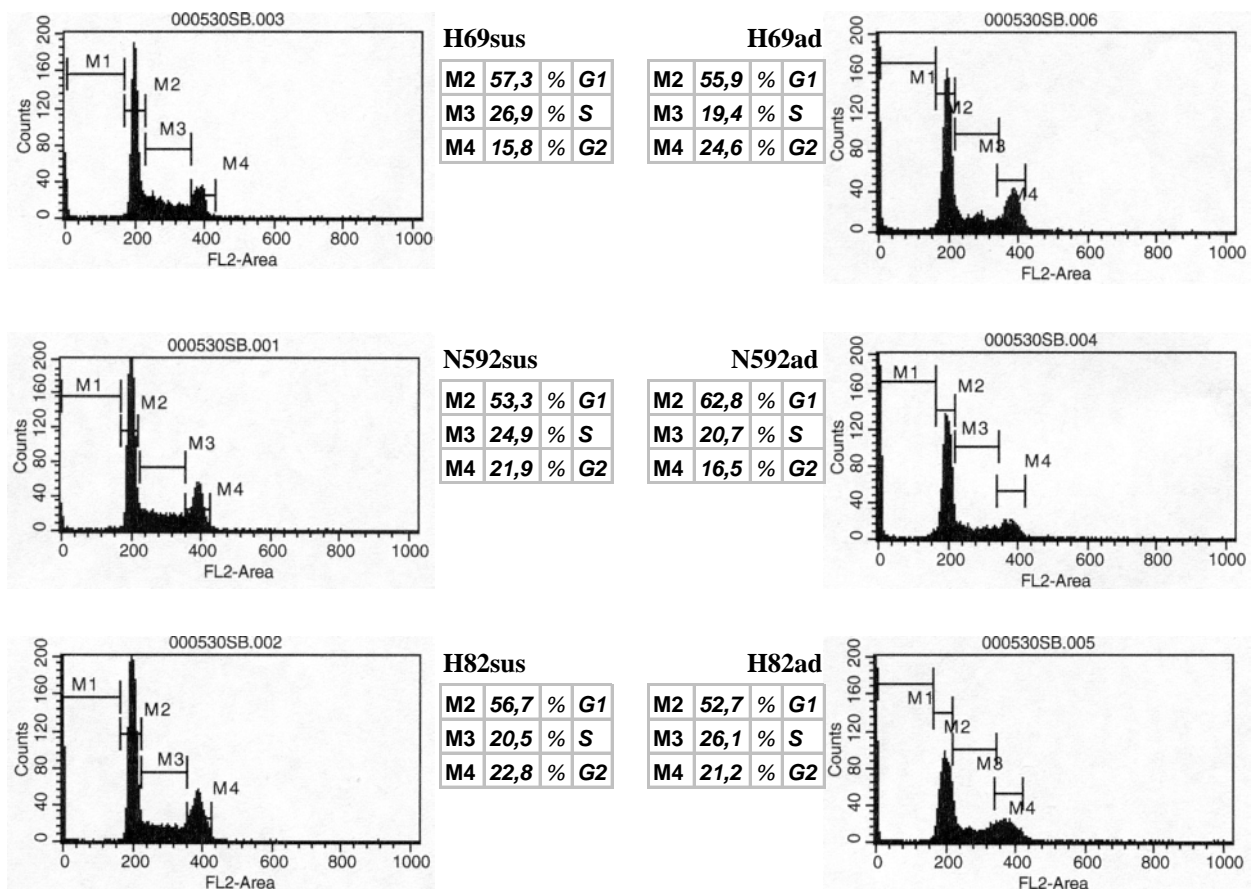


Abb. 3-19: Zellzyklusanalyse der Zelllinien H69sus/H69ad, N592sus/N592ad und H82sus/H82ad mittels FACS. Zellen in der G1-Phase entsprechen dem Bereich M2, Zellen in der S-Phase dem Bereich M3 und Zellen in der G2-Phase dem Bereich M4.

Man erkennt eine typische zweigipflige Kurve, die dem Wachstumsverhalten einer nicht-synchronisierten Zelllinie entspricht. Der Bereich M2 markiert die erste Spitze, die Zellen in der G1-Phase symbolisiert. Die zweite Spitze, durch M4 markiert, stellt Zellen in der G2-Phase dar. Die Zellen haben ihre DNA verdoppelt, was zu einer Zunahme des Fluoreszenzsignals führt, dargestellt als Auslenkung nach rechts auf der X-Achse. Zwischen den beiden Spitzen, markiert durch den Marker M3, befindet sich die S-Phase.

Betrachtet man die Ergebnisse getrennt für die drei Zelllinien-Pärchen, so sieht man für H69sus/H69ad etwa gleiche Anteile der Zellen, die sich in der G1-Phase befinden, nämlich 57,3% bei H69sus und 55,9% bei H69ad. Dies spricht für eine etwa gleiche Proliferationsgeschwindigkeit. Bei N592ad befinden sich 62,8% in der G1-Phase gegenüber 53,3% bei N592sus, was auf eine etwas langsamere Proliferation von N592ad hinweist. H82ad hat eine leicht verminderte G1-Phase (52,7%) und leicht vergrößerte S-Phase (26,1%) im Vergleich zu H82sus, welche zu 56,7% in der G1-Phase und zu 20,5% in der S-Phase ist, was auf eine leicht höhere Proliferationsgeschwindigkeit bei H82ad hinweist.

Zusammenfassend ergibt sich aus der Analyse der Zellzyklusphasen kein entscheidender Hinweis auf eine Verschiebung bestimmter Zellzyklusphasen unter adhärentem Wachstum.

4. Diskussion

Chemo-/Radioresistenz bedeutet für Patienten mit disseminierten oder inoperablen Neoplasien oft ein Versagen der letzten derzeit erhältlichen effektiven Therapieoption. Das kleinzellige Bronchialkarzinom (SCLC) ist ein primär chemo-/strahlensensibler Tumor, der zu Therapiebeginn recht gute Remissionsraten zeigt, aber im Verlauf der Therapie so gut wie immer als chemo-/strahlenresistenter Tumor rezidiert. Es gibt verschiedene Modellvorstellungen zur Entwicklung einer solchen Chemo-/Radioresistenz in malignen Zellen. Da Zytostatika und Gamma-Strahlen einen wesentlichen Teil ihrer Wirkung durch Apoptoseinduktion ausüben, besteht ein Modell in der Vorstellung, daß in den resistenten Zellen das Apoptoseprogramm inhibiert ist. Mit solch einem Modell setzt sich auch diese Arbeit auseinander.

Basis solcher Modelle sind meist Zellkultursysteme. Dieses Projekt beschäftigt sich mit einem Zellkultursystem, welches auf den drei SCLC-Zelllinien NCI-H69, NIH-N592 und NCI-H82 basiert. In unserer Arbeitsgruppe ist es gelungen, von diesen in Suspension wachsenden Zellen Subklone zu kultivieren, die flach und ausgezogen, also adhärent, am Zellflaschenboden wuchsen. Die adhärenen Subklone H69ad und N592ad, deren Suspensions-Ausgangszelllinien H69sus und N592sus einem klassischen SCLC entsprechen, zeigten auf RT-PCR-Ebene einen Verlust neuroendokriner Marker wie L-Dopa-Decarboxylase oder Neuronspezifische Enolase, was typisch für sogenannte variante SCLC ist, ein Subtyp des kleinzelligen Bronchialkarzinoms mit noch schlechterer Prognose. Diese adhärenen Subklone zeigten sich interessanterweise in Versuchen zur Bestimmung der Resistenzlage gegenüber mehreren Zytostatika und Gamma-Strahlung als deutlich resistenter im Vergleich zu ihren Suspensionsausgangszelllinien. Die Fraktion der apoptotischen Zellen nach Bestrahlung mit Gamma-Strahlen war in den adhärenen Subklonen deutlich geringer als in den Suspensions-Ausgangszelllinien. Auf der Suche nach Ursachen für diese erhöhte Resistenz der adhärenen Subklone wurde mittels Western-Blot eine konstitutionelle Aktivierung der Proteinkinase B/Akt alleine in den adhärenen Subklonen H69ad und N592ad, nicht jedoch in den in Suspension wachsenden Ausgangszelllinien H69sus und N592sus gefunden. PKB/Akt, ein zentrales Protein in der Regulation der Apoptose mit anti-apoptotischer Wirkung, könnte so eine Schlüsselfunktion im beschriebenen Modell im Sinne einer Adhärenz-induzierten Chemo-/Radioresistenz durch Apoptoseinhibition einnehmen.

4.1 Einordnung der Ergebnisse der Versuche zur Chemo-/Radioresistenz und zur Apoptoseinduktion durch Gamma-Strahlung

4.1.1 Die Zelllinien bei Zytostatika-Exposition

Man betrachte die Ergebnisse (siehe Kapitel 3.4) einschließlich der zusammengefaßten IC50-Werte (siehe Tabelle 3-2 bis 3-5). Die Zelllinien H69sus/H69ad und N592sus/N592ad lassen sich sehr gut zusammen besprechen, da die Ergebnisse vom Trend her stets gleich ausfallen. Auffällig ist die zum Teil ausgeprägte Resistenz der adhärennten Zelllinie im Vergleich zur Suspensions-Ausgangszelllinie. Am ausgeprägtesten findet sich diese Resistenz bei N592ad (verglichen mit N592sus) bei Exposition gegenüber Etoposid und Cyclophosphamid. Betrachtet man die IC50-Werte, also die Zytostatika-Konzentration, bei der die Zellzahl im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle genau halbiert ist, sieht man, daß N592ad sogar resistenter als die als chemoresistent geltende großzellige Kontrollzelllinie 103H ist. Das Gesagte gilt ebenfalls für H69ad (im Vergleich zu H69sus), nur etwas weniger ausgeprägt.

Fridman et al. (1990) führten vergleichbare Versuche an SCLC-Zelllinien mit Zytostatika durch: Sie kultivierten sechs SCLC-Linien auf Laminin (einem Bestandteil der extrazellulären Matrix), woraufhin fünf von sechs Zelllinien adhärennt wurden, ohne jedoch wesentlich ihre Morphologie zu verändern. Die adhärennten Zellen waren resistenter gegen die Zytostatika Doxorubicin, Etoposid und Cisplatin. Die ermittelten IC50-Werte lagen bei Etoposid bei 16µM für die unbehandelten Linien im Vergleich zu 22µM für die auf Laminin kultivierten Linien (Faktor 1,4), für Doxorubicin bei 1µM im Vergleich zu 11µM (Faktor 11) und für Cisplatin bei 18µM im Vergleich zu 26µM (Faktor 1,4). Aus diesen Werten errechneten die Autoren eine signifikante Chemoresistenz für die an Laminin gebundenen Linien. Beim Vergleich der Daten von Fridman et al. mit den Daten der vorliegenden Arbeit wird deutlich, daß die erzielbare kontakt-induzierte Resistenz bei den Zelllinien H69ad und N592ad mindestens genauso ausgeprägt ist, wenn nicht deutlicher, als die bei Fridman et al.

Betrachtet man die Ergebnisse der Zelllinien H82sus/H82ad zur Chemoresistenz, fällt kein eindeutiger Trend auf. Die adhärennte Linie H82ad ist nur marginal resistenter als H82sus, bei Betrachtung der IC50-Werte stellt man fest, daß H82sus und H82ad insgesamt deutlich sensibler als N592ad und H69ad sind.

4.1.2 Die Zelllinien bei Gamma-Strahlen-Exposition

Betrachtet man die Ergebnisse der Zelllinien N592sus/N592ad und H69sus/H69ad, die für Exposition mit Gamma-Strahlen der Stärke 2Gy und 8Gy ermittelt wurden (siehe Kapitel 3.5), so setzt sich der Trend, der für die Zytostatika ermittelt wurde, fort. Wiederum sind die adhärenenten Zelllinien resistenter als ihre in Suspension wachsenden Ausgangszelllinien und wiederum ist der Effekt am deutlichsten ausgeprägt bei N592ad.

Carney et al. (1983) haben ebenfalls SCLC-Linien mit Gamma-Strahlen bestrahlt und dabei sogar NCI-H69 und NCI-H82 mitgeführt. Sie haben diese Linien damals als Zelllinie etabliert. Die ermittelten Daten sind jedoch nicht direkt mit den in dieser Arbeit erhobenen Daten vergleichbar, da die Autoren die Überlebensfraktion anhand von "clonogenic assays" ermittelt haben, bei der Zellen nach Bestrahlung in Einzelzellsuspension in Medium mit 0,5% Agarose ausgesät werden und dann die Zahl der Kolonien nach 21 Tagen ins Verhältnis zu einer unbestrahlten Kontrolle gesetzt wird. Aus der für H69 ermittelten Kurve kann man für 2 Gy (200 rad) einen Wert von ca. 20% ablesen. Dies hieße, daß nach einer Bestrahlung mit 2 Gy nur 20% der Zellen weiter proliferieren.

Bei Betrachtung der Zelllinien H82sus/H82ad (Abb. 3-10) zeigt sich der adhärenente Subklon ebenfalls resistenter gegenüber Exposition von Gamma-Strahlen als die Suspensionsausgangszelllinie.

Bei der Einschätzung der Daten zur Chemo-/Radioresistenz ist zu beachten, daß Chemotherapeutika und Gamma-Strahlung besonders auf sich schnell teilende Zellen wirken. Dies ist schon an der Tatsache ablesbar, daß Neoplasien, die allein durch Chemotherapie zu heilen sind, wie z.B. Hodentumore, Leukämien im Kindesalter und einige Lymphome, dazu tendieren, besonders schnell zu proliferieren (Grindey 1990). Vor diesem Hintergrund sind die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse (siehe Kapitel 3.9) zu berücksichtigen. H69sus und H69ad befinden sich zu etwa gleichen Teilen in der G1-Phase, was für eine gleich hohe Proliferationsgeschwindigkeit spricht. Bei N592ad befinden sich 62,8% in der G1-Phase gegenüber 53,3% bei N592sus, was auf eine etwas langsamere Proliferation von N592ad hinweist. Dieser Effekt ist nicht ausgeprägt, könnte jedoch auch mit zu der deutlichen beobachteten Resistenz der Linie N592ad beitragen.

4.1.3 Apoptoseinduktion in den Zelllinien durch Gamma-Strahlung

Zytostatika und Gamma-Strahlung üben einen Großteil ihrer Wirkung durch die Induktion von Apoptose aus (siehe Kapitel 1.1.3). Es liegt daher nahe, die Multi-Resistenz in vielen malignen Zellen auf der Basis einer Inhibition des Apoptoseprogramms zu erklären. Es war daher von großem Interesse, ob sich nach der gefundenen Resistenz der Zelllinien N592ad und H69ad gegen Zytostatika und Gamma-Strahlung Unterschiede in der Fraktion apoptotischer Zellen nach Bestrahlung ergeben würden. Betrachtet man die Ergebnisse der Hoechst33342/Propidiumiodidfärbung (siehe Kapitel 3.6.1), so wird deutlich, daß die Daten zur Apoptoseinhibition die bisher ermittelten Daten zur Chemo-/Radioresistenz gut ergänzen. In den adhärenenten Subklonen N592ad und H69ad gibt es deutlich weniger apoptotische Zellen nach Bestrahlung als im Vergleich zu ihren Suspensions-Ausgangszelllinien (siehe Abb. 3-14). Gamma-Strahlung hat also in den adhärenenten Subklonen eine geringere Apoptose-auslösende Wirkung, was eine Erklärung für die höhere Zellzahl im Verhältnis zur unbestrahlten Kontrolle der adhärenenten Linien (wie oben diskutiert) drei Tage nach Bestrahlung mit Gamma-Strahlen im Vergleich zu den Suspensions-Linien sein könnte. Auffällig ist auch die bereits spontan höhere Apoptoserate von N592sus (2,9%) im Vergleich zu N592ad (0,8%), die von Sirzen et al. (1998) als Indikator für die intrinsische Radiosensitivität einer Zelllinie gesehen wird. Für H82ad findet sich ebenfalls eine deutlich niedrigere Apoptoserate im Vergleich mit der Suspensions-Ausgangszelllinie H82sus.

4.2 Die adhärenenten Subklone N592ad und H69ad entsprechen einer varianten kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinie

Beim kleinzelligen Bronchialkarzinom (SCLC) wird neben der normalen, klassischen Form eine variante Form unterschieden (siehe Kapitel 1.1.3). Um Verwechslungen zu vermeiden, muß man beachten, daß der Begriff variantes SCLC sowohl auf der Ebene der Zellkultur definiert wurde, als auch auf histologisch/klinischer Ebene (Abeloff et al. 1979).

Auf Zellkulturebene definierten Gazdar et al. (1985), die zu Beginn der 80er Jahre viele der heute weit verbreiteten SCLC-Zelllinien etablierten, den Begriff der varianten SCLC-Zelllinie. Sie fanden bei 10 von 50 ihrer SCLC-Zelllinien a) eine andere, SCLC-untypische Morphologie, nämlich Wuchs als adhärenente, epitheloide Zelllinie oder Wuchs in loser, nicht

mehr dichtgepackter Einzelzellsuspension b) den Verlust der SCLC-typischen Expression neuroendokriner Markermoleküle wie L-Dopa-Decarboxylase, Gastrin releasing peptide (Bombesin) oder Neuronspezifische Enolase und c) erhöhte Resistenz gegenüber Gamma-Strahlung. Die Zelllinien NCI-H69, in dieser Arbeit meist H69sus genannt, und NIH-N592 (N592sus) gehören ebenfalls zu den von Gazdar und Carney etablierten Zelllinien, wobei H69sus und N592sus einem klassischen SCLC entsprechen. Um die von uns kultivierten adhärenenten Subklone H69ad und N592ad einzuordnen, muß man sich die Expression der neuroendokrinen Markermoleküle anschauen (siehe Kapitel 3.3, insbesondere Tabelle 3-2). Man stellt einen Verlust oder eine Herunterregulierung der neuroendokrinen Marker L-Dopa-Decarboxylase, Gastrin releasing peptide, Chromogranin A und Neuronspezifischer Enolase in H69ad und N592ad fest. Desweiteren besitzen die Linien als adhärenenter Subklon eine veränderte Morphologie und sie zeichnen sich durch eine erhöhte Resistenz aus, wie in 4.1 diskutiert. Somit sind die Kriterien aus Gazdar et al. (1985) erfüllt, H69ad und N592ad entsprechen einem varianten SCLC.

Wir haben also in unserem Zellkultursystem die Entstehung zweier varianter SCLC-Zelllinien (H69ad und N592ad) beobachten können, die aus klassischen SCLC-Zelllinien hervorgegangen sind.

Betrachtet man die Ergebnisse für die Zelllinien H82sus/H82ad, so ergibt sich kein eindeutiges Bild. Man findet in H82sus einen Verlust von L-Dopa-Decarboxylase, jedoch werden die Neuronspezifische Enolase und Chromogranin A weiterhin stark exprimiert. H82ad exprimiert ebenfalls noch Neuronspezifische Enolase und Chromogranin A. Zwischen den Linien H82sus und H82ad zeigt sich kein Unterschied in der Chemoresistenz (siehe oben), jedoch auch kein Unterschied in der Aktivierung von PKB/Akt (siehe Kapitel 3.7). Aus diesem Grunde werden die Ergebnisse dieser Linien in der Diskussion nicht weiter berücksichtigt. Es bleibt als spekulativ anzunehmen, daß in diesen Linien der Prozeß der Transdifferenzierung nur unvollständig stattgefunden hat.

Daß eine Umdifferenzierung von einem klassischen in ein variantes SCLC weder *in vitro* noch *in vivo* eine Seltenheit ist, zeigen z. B. Goodwin und Baylin (1982), die von einer kleinzelligen Zelllinie OH-1 berichten, die nach 16 Monaten in Kultur eine subtile Veränderung ihrer Morphologie durchmachte. Diese Veränderung ging einher mit einem Verlust von L-Dopa-Decarboxylase-Aktivität und einer deutlich erhöhten Resistenz

gegenüber Gamma-Strahlung. Brodin et al. (1995) beobachteten, wie die Zelllinie U-1906 nach 4-6 Monaten in Kultur auf einmal ein adhärenteres Wachstumsmuster einnahm, was begleitet war von einem Resistenzgewinn gegenüber ionisierender Strahlung und einer erhöhten Klonogenität der Zelllinie.

Auf histologisch/klinischer Ebene zeigen Abeloff et al. (1979) bei Untersuchungen an Autopsiematerial, daß die varianten SCLC, also kombinierte SCLC mit großzelligen, drüsigen oder undifferenzierten Anteilen, deutlich weniger Aktivität des neuroendokrinen Markers L-Dopa-Decarboxylase aufwiesen. Somit geht auch *in vivo* das variante SCLC mit einem Verlust neuroendokriner Marker einher. Die Prognose des varianten SCLC ist nochmals signifikant schlechter als die der klassischen SCLC-Form (z. B. Fushimi et al. 1992), nicht zuletzt, weil das variante SCLC mit einer Therapieresistenz gegen Chemo- und Strahlentherapie assoziiert ist. So verglichen z.B. Brambilla et al. (1992) bei 20 Patienten die Histologie des chemosensitiven Tumors zu Beginn der Chemotherapie mit der Histologie des resistenten Tumors bei Auftreten eines chemoresistenten Rezidivs. Während sich zu Therapiebeginn bei allen 20 Patienten ein klassisches SCLC zeigte, fand sich in den chemoresistenten Rezidivtumoren bei 10 Patienten autopsisch ein variantes SCLC als überwiegender Tumortyp.

Eine Verknüpfung zwischen dem varianten SCLC auf klinischer Ebene und auf Zellkultur-Ebene machten Berendsen et al. (1988). Sie etablierten mehrere Zelllinien von einem SCLC-Patienten, dessen Tumor sich initial als sensitiv, später dann als resistent gegenüber Zytostatika zeigte. Diese Zelllinien spiegelten auch *in vitro* den Verlauf von sensitiv zu resistent wieder und die resistente Zelllinie zeigte einen Verlust neuroendokriner Marker.

Auch Metastasen weisen häufig Anteile eines varianten SCLC auf. Fushimi et al. (1996), die wie oben zitiert in 14,3% der Fälle bei Autopsie im Primärtumor ein variantes SCLC fanden, diagnostizierten in Fernmetastasen signifikant mehr variante SCLC-Anteile, nämlich in 66% der Hirnmetastasen, 36% der Lebermetastasen und 28,8% der Nebennierenmetastasen. Das variante SCLC ist also klinisch begleitet von einer erhöhten Metastasierungsneigung. Vor diesem Hintergrund ist es interessant, daß Salge et al. (2001), die mit dem von uns entwickelten Zellkulturmodell arbeiteten, in den adhären H69ad, nicht aber in H69sus eine Sekretion der zur Metastasierung benötigten Matrix Metalloproteinasen-2 und -9 nachweisen konnten.

Somit ergibt sich ein Zellkulturmodell, in dem die varianten SCLC-Linien H69ad und N592ad mit den klassische Ausgangszelllinien H69sus und N592sus verglichen werden können. Es können so die Mechanismen des Unterschiedes eines klassischen SCLC im Vergleich zu einem varianten SCLC experimentell untersucht werden einschließlich der damit assoziierten Phänomene wie Chemoresistenz und Strahlenresistenz.

4.3 Adhärenz vermittelte Chemo-/Radioresistenz (CAM-DR) verläuft über eine Inhibition der Apoptose

Ein naheliegendes Modell, die Multi-Resistenz vieler malignen Zellen gegenüber verschiedenen Zytostatika und Gamma-Strahlung zu erklären, ist die Vorstellung, daß in den resistenten Zellen das Apoptoseprogramm herunterreguliert ist. Es stellt sich die Frage, wie solch ein antiapoptotisches Signal, das eine Zytostatika-exponierte Zelle vor dem programmierten Zelltod schützt, generiert wird.

Eine Möglichkeit ist die Aufnahme eines anti-apoptotischen Signals an extrazellulären Strukturen. Durch Adhärenz, zum Beispiel an Bestandteile der extrazellulären Matrix oder der Basalmembran, entstehen Signale, die in die Zelle als Überlebenssignal fortgeleitet werden. Damiano et al. (1999) prägten den Ausdruck der Adhärenz vermittelten Chemoresistenz (*cell adhesion mediated-drug resistance*, CAM-DR). Sie setzten die chemo-sensitive Myeloma-Zelllinie 8226 einer Doxorubicin-Exposition aus und verglichen die normalen Suspensionszellen mit Zellen, die zuvor auf Fibronectin, einem Protein der extrazellulären Matrix, kultiviert worden waren und an diesem adhären geworden waren. Die adhären Zellen waren wesentlich resistenter gegen Doxorubicin, was sich auch in einer deutlich geminderten Zahl apoptotischer Zellen ausdrückte. Das durch die Adhärenz am Fibronectin erzeugte Signal wurde über $\alpha 4\beta 1$ -Integrine und $\alpha 5\beta 1$ -Integrine, die Fibronectin-Rezeptoren, in die Zelle geleitet. Eine über Integrine vermittelte Adhärenz überträgt also in diesem Modell das anti-apoptotische Signal.

Ein weiterer sehr interessanter Bericht über ein Modell, in dem durch Integrin-vermittelte Adhärenz eine erhöhte Resistenz gegen Zytostatika erreicht wird, stammt von Sethi et al. (1999). Die Autoren verwendeten kleinzellige Bronchialkarzinomzelllinien, nämlich die auch in dieser Arbeit verwendete NCI-H69 sowie zwei weitere Linien. Die Zelllinien wurden auf Fibronectin, Laminin oder Kollagen IV kultiviert, woraufhin sie über ihre

Integrin-Rezeptoren adhären an die Bestandteile der extrazellulären Matrix wurden. Nun wurden sie einer Doxorubicin-, Cyclophosphamid- oder Etoposid-Behandlung ausgesetzt. Die adhärenen Zellen zeigten sich deutlich resistenter im Vergleich zu ihren nicht adhärenen Zelllinien. Ferner zeigte sich eine deutliche Inhibition des Apoptoseprogramms in den adhärenen Zellen. Interessanterweise ließ sich diese Resistenz der adhärenen Zellen durch Hinzufügen eines anti- $\beta 1$ -Integrin-Antikörpers wieder aufheben, was in diesem System einen über das $\beta 1$ -Integrin laufenden Signalweg als Überträger der Adhärenz-erzeugten Resistenz identifiziert.

In der vorliegenden Arbeit bildeten die adhärenen Subklone H69ad und N592ad eine Adhärenz zum lediglich Poly-L-Lysin beschichteten Boden der Zellkulturflasche aus. Poly-L-Lysin ist die Standardbeschichtung normaler Gewebekultur-Gefäße. Diese Adhärenz ist eine andere als die oben beschriebene von Sethi, in der die Adhärenz durch Kultivierung auf Bestandteilen der extrazellulären Matrix erreicht wird. Die adhärenen SCLC-Zellen bei Sethi et al. verändern ihre Morphologie nur ein wenig hin zu einem neuronförmigen Aussehen und sie zeigen keinen Verlust neuroendokriner Marker. Die Zellen haben sich nicht, wie bei den adhärenen H69ad und N592ad beobachtet, in ein variantes SCLC umdifferenziert. Die varianten SCLC-Linien H69ad und N592ad nehmen eine regelrecht epitheloide Morphologie an. Besonders von Interesse ist hierzu die Expression der Integrine auf RT-PCR-Ebene (siehe Tabelle 3-2). Das $\beta 1$ -Integrin ist sowohl in den Suspensionszellen, als auch in den adhärenen Subklonen stark und gleichmäßig exprimiert. Es scheint im vorliegenden System also nicht an der Poly-L-Lysin-Adhärenz beteiligt zu sein. Jedoch sind die $\alpha 2$ -, $\alpha 3$ - und $\beta 4$ -Integrine in den adhärenen Subklonen hochreguliert. Diese Integrine könnten die Adhärenz an Poly-L-Lysin in den Subklonen H69ad und N592ad vermitteln und so eventuell ein anti-apoptotisches Signal in die Zelle leiten.

Weitere Berichte, in denen Integrin-vermittelte Adhärenz in malignen Zellen zu einer Resistenz gegen Zytostatika führt, finden sich zum Beispiel in Uhm et al. (1999) oder de la Fuente et al. (2002).

Es stellt sich die Frage, was diese Modelle leisten können, um die Mechanismen primärer oder sekundärer Chemo-/Radioresistenz *in vivo* zu erklären.

Taylor et al. (1999) haben für B-Lymphom-Zellen ein Zellmodell entwickelt, in dem Resistenz gegenüber Zytostatika nur erreicht wird, wenn neben dem $\alpha 4\beta 1$ -Integrin-

Rezeptor auch der CD40-Rezeptor und der Interleukin-4-Rezeptor besetzt sind. Niedrig-maligne B-Zell-Lymphome sind zu Therapiebeginn oft sehr sensibel für Chemotherapie. Es kommt jedoch meist zum Auftreten eines chemoresistenten Rezidivs, genau wie beim kleinzelligen Bronchialkarzinom. Die Autoren erklären dies durch eine zunächst gute Reduktion der sensitiven Tumormasse. Einigen wenigen Zellen gelingt es jedoch, an einem bestimmten Ort die drei oben aufgeführten Überlebenssignale von extrazellulären Strukturen zu erhalten und so die zytostatische Therapie zu überstehen. Die Autoren prägen hierfür den Begriff der Überlebensnische (*survival niche*). Diese Zellen, geschützt in ihrer Überlebensnische und klinisch oft nicht mehr nachweisbar, könnten nun zusätzliche längerfristige Resistenzmechanismen, wie zum Beispiel die *Multi Drug Resistance*, entwickeln und im Verlauf zum Rezidiv führen.

Sethi et al. (1999) beschreiben, wie sich ein SCLC-Primärtumor mittels Adhärenz-induzierter Resistenz Überlebensvorteile verschaffen kann: Sie zeigen mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen, daß der Primärtumor umgeben von einer extensiven extrazellulären Matrix, bestehen aus Kollagen IV, Laminin und Fibronektin, ist. Dies gilt auch für Metastasen entsprechender Tumore. Die *in vitro* nachgewiesene Resistenz, vermittelt über Kultivierung auf Bestandteilen der extrazellulären Matrix, ist also direkt auf die *in vivo* Situation übertragbar, wo Tumorzellen und extrazelluläre Matrix im Tumor zusammen lokalisiert sind.

4.4 Chemo-/Radioresistenz in den adhärenenten Subklonen H69ad und N592ad korreliert mit konstitutiv aktivierter Proteinkinase B/Akt

Es stellt sich die Frage, über welchen Signaltransduktionsweg das oben diskutierte Adhärenz induzierte anti-apoptotische Signal intrazellulär weitergeleitet wird.

Ein möglicher Signaltransduktionsweg könnte über PKB/Akt laufen. Wir fanden PKB/Akt in den adhärenenten Zelllinien H69ad und N592ad konstitutionell aktiviert, während es in den Suspensionszelllinien H69sus und N592sus nicht aktiviert war (siehe Kapitel 3.7).

PKB/Akt ist als Serin-/Threoninkinase an zentraler Stelle in der Regulierung der Apoptose beteiligt und übt eine potente anti-apoptotische Funktion aus (siehe Kapitel 1.4.1.1). So kann PKB/Akt das Bcl-2 Familienmitglied BAD phosphorylieren und inaktivieren, den

Transkriptionsfaktor NF- κ B freisetzen und damit aktivieren, die Familie der *forkhead* Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und inaktivieren oder Caspase-3 und Caspase-9 direkt hemmen. Dies deutet nur einige der anti-apoptotischen Möglichkeiten von PKB/Akt an, für Weiteres und Referenzen siehe Kapitel 1.4.1.1.

Die gefundene Aktivierung der PKB/Akt in den adhärenen Subklonen H69ad und N592ad paßt gut zu den Ergebnissen, daß die Subklone H69ad und N592ad resistenter gegen Gamma-Strahlen induzierte Apoptose sind. Somit ist ein potenter Signalübertragungsweg aufgezeigt, über den ein Adhärenz-induziertes Überlebenssignal anti-apoptotisch wirken kann.

King et al. (1997) zeigten, wie die Bindeglieder auf dem Signaltransduktionsweg zwischen den Integrinen und PKB/Akt aussehen. Zelladhärenz an Fibronectin führte zu einer Integrin-abhängigen Aktivierung der Proteinkinase B/Akt über eine Aktivierung der focal adhesion kinase (FAK), welche konsekutiv die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-K) aktiviert. Die PI3-K ist bekannt als Aktivator von PKB/Akt, der genaue Mechanismus ist in Kapitel 1.4.1.1 beschrieben. Damit ist eine Verbindung zwischen Zelladhärenz an Fibronectin, den Integrinen und PKB/Akt aufgezeigt.

Ein weiteres Beispiel, wie Adhärenz einen anti-apoptotischen Signalweg auslöst, der über die Integrine, PI3-K und PKB/Akt läuft, findet sich in Khwaja et al. (1997): Normale epitheliale Zellen wachsen adhären zur Basalmembran. Werden sie von der Basalmembran abgelöst, durchlaufen sie den Prozeß der Apoptose. Dies ist ein Phänomen, welches *Anoikis* (griechisch: Heimatlosigkeit) genannt wird. Die Autoren zeigten, daß die Adhärenz der epithelialen Zellen an der Basalmembran ein antiapoptotisches Signal erzeugt, welches über die Integrine, die PI3-K und PKB/Akt übertragen wird. Werden die Zellen jedoch von der Basalmembran abgelöst, kommt es zu einem schnellen Rückgang der Aktivierung der PI3-K und PKB/Akt, was zu *Anoikis* führt. PKB/Akt vermittelt also auch in normalen epithelialen Zellen ein Integrin-Adhärenz induziertes anti-apoptotisches Signal.

Daß dieses Integrin-vermittelte anti-apoptotische Signal über PKB/Akt zu einer Resistenzentwicklung gegen Zytostatika in Zellkulturlinien führen kann, zeigten Aoudjit und Vuori (2001). Sie untersuchten eine Resistenz zweier Mammakarzinomzelllinien gegen Paclitaxel. Werden die Zellen auf Vitronectin, Kollagen I oder Fibronectin kultiviert, sind sie deutlich resistenter gegen Paclitaxel-induzierte Apoptose. Dieser Effekt läßt sich durch

Antikörper gegen das $\alpha 5$ - oder das $\beta 1$ -Integrin bei Kultivierung auf Fibronectin und durch Antikörper gegen das $\alpha 2$ - oder das $\beta 1$ -Integrin bei Kultivierung auf Kollagen aufheben. Als Mechanismus identifizierten sie mittels Transfektion von dominant negativen PI3-K- oder PKB/Akt-Konstrukten eine Aktivierung des PI3K-PKB/Akt-Signalweges.

Die Resistenz der Subklone H69ad und N592ad könnte also folgendermaßen erklärt werden: Eine Umdifferenzierung der Zelllinien in ein variantes SCLC führt zu einer Poly-L-Lysin-Adhärenz, in der über $\alpha 2$ -Integrine, $\alpha 3$ -Integrine, $\beta 4$ -Integrine oder andere Adhärenz-vermittelnde Signalmoleküle eine Aktivierung des antiapoptotischen PKB/Akt-Signalweges stattfindet.

Daß diese Aktivierung des PKB/AKT-Signalweges in den Zelllinien H69ad und N592ad auch wirklich Adhärenz-induziert ist, konnten wir zeigen, in dem wir den adhärenenten Phänotyp der Linien H69ad und N592ad durch Kultivierung auf völlig unbeschichteten (kein Poly-L-Lysin) Kulturschalen wieder in einen in Suspension wachsenden Phänotyp rückführen konnten. Diese Zellen wurden H69ad reversibel (kurz H69ad rev) und N592ad reversibel (N592ad rev) genannt. Von diesen Zellen wurde ein Proteinextrakt gewonnen und die Aktivität von PKB/Akt untersucht (siehe Kapitel 3.7). Interessanterweise war die Aktivierung von PKB/Akt in den adhärenenten Klonen H69ad und N592ad durch die Rückführung der adhärenenten Zellen zu Suspensions-Zellen (H69ad rev und N592ad rev) fast vollständig aufgehoben. Die Aktivierung von PKB/Akt ist also direkt Adhärenz-gekoppelt, bzw. hierüber induziert.

4.4.1 Einordnung der Ergebnisse der PKB/Akt-Antisense-Oligonukleotid Versuche

Um einen direkten Beweis zu erbringen, daß die gefundene PKB/Akt-Aktivierung in den Zelllinien H69ad und N592ad auch direkt für die gesehene Resistenzentwicklung verantwortlich ist, führten wir Versuche mit spezifisch hergestellten PKB/Akt Antisense-Oligonukleotiden durch, welche wir freundlicherweise von Dr. Emily Slater, Institut für Immunologie und Tumorforschung, Philipps-Universität Marburg (IMT), erhielten (siehe Kapitel 2.2.5). Durch die Transfektion mit den PKB/Akt Antisense-Oligonukleotiden läßt sich so idealerweise PKB/Akt in den Zelllinien spezifisch ausschalten und untersuchen, ob die gefundene Resistenz der adhärenenten Zellen rückgängig zu machen ist (Ergebnisse siehe Kapitel 3.8).

Die Zelllinien H69sus/H69ad und N592sus/N592ad wurden an zwei aufeinander folgenden Tagen mit dem PKB/Akt-Antisense-Oligonukleotid in verschiedenen Konzentrationen oder mit einem Missense-Oligonukleotid (zur Kontrolle) transfiziert. Dann wurden sie bestrahlt oder zum Proteinextrakt für einen PKB/Akt-Western-Blot verwendet. Drei Tage nach Bestrahlung wurde die Zellzahl gemessen. Betrachtet man die Ergebnisse zur Zellzahl drei Tage nach Bestrahlung (siehe Abb. 3-18) so werden zwei Hauptbeobachtungen deutlich:

Die Zellzahl nach Transfektion mit 100nM und 300nM des Antisense-Oligonukleotides nimmt bereits in den unbestrahlten Zellen, sowohl in den Suspensions-, als auch in den adhären Zellen, deutlich ab. Geht man von einer spezifischen Wirkung des Antisense-Oligonukleotids aus, folgt daraus, daß die komplette Ausschaltung von PKB/Akt für die SCLC-Zellen nicht mit dem Leben vereinbar ist. Durch die komplette Ausschaltung wird bereits in den unbestrahlten Zellen so massiv Apoptose induziert, daß die zusätzliche Bestrahlung mit 2 Gy oder 8 Gy kaum zusätzliche Effekte auslöst.

Betrachtet man die Ergebnisse der mitgeführten Missense-Oligonukleotide bei der Zelllinie H69sus und H69ad, so fällt, z. B. bei H69ad 300nM Missense, ein genauso ausgeprägter Effekt beim Missense-Oligonukleotid wie beim Antisense-Oligonukleotid auf. Der Effekt bei 100nM Missense ist nicht ganz so stark wie der Effekt des Antisense-Oligonukleotids, aber immernoch ausgeprägt. Dies läßt auf massive unspezifisch toxische Wirkungen des Antisense-Oligonukleotids schließen.

4.5 Zukunftsaussichten

Für die Zukunft interessiert in erster Linie, ob die gewonnenen Erkenntnisse zu einem besseren Verständnis der Chemo-/Radioresistenz führen und ob sich daraus eventuell Therapieoptionen ableiten lassen, die dem Patienten Nutzen bringen.

Das in dieser Arbeit charakterisierte Zellkultursystem aus H69sus/H69ad und N592sus/N592ad könnte in Versuchen mit Nacktmäusen auf seine Übertragbarkeit auf die *in vivo* Situation überprüft werden.

Die Proteinkinase B/Akt, die in den resistenten Zelllinien H69ad und N592ad konstitutiv aktiviert ist, bietet ein vielversprechendes Ziel für neue pharmakologische Produkte, ebenso

die oberhalb im PKB/Akt-Signalweg gelegene PI3-Kinase. Ein Beispiel hierfür findet sich z. B. in Nakashio et al. (2000). Sie berichten, daß der Topoisomerase I-Inhibitor Topotecan, welcher zu den neueren Zytostatika gehört, neben seiner Funktion als Inhibitor der Topoisomerase I auch eine Dephosphorylierung von PKB/Akt induziert und damit eine Herunterregulierung des anti-apoptotischen PKB/Akt-Signalweges bewirkt. Interessanterweise zeigt dieses Zytostatikum in einer Zusammenfassung einiger Studien zur Behandlung von SCLC-Hirnmetastasen die besten Remissionsraten der getesteten Zytostatika (Grossi et al. 2001).

Weitere pharmakologische Entwicklungen werden sicherlich zeigen, ob das Konzept der Chemo-/Radioresistenz durch eine Inhibition der Apoptose, zum Beispiel über den PKB/Akt-Signalweg in sich schlüssig ist und ob die primäre oder sekundäre Chemo-/Radioresistenz mittels spezifisch hergestellter neuer Pharmaka überwunden werden kann.

5. Zusammenfassung

Das kleinzellige Bronchialkarzinom (SCLC) gehört zu den malignen Neoplasien mit einer extrem schlechten Prognose. Die Chemo-/Radiotherapie zeigt sich zwar initial als sehr effektiv mit guten Remissionsraten, es kommt aber im Krankheitsverlauf praktisch unausweichlich zu einem Rezidiv auf Grund einer sekundär erworbenen Resistenz gegenüber den eingesetzten Therapeutika. Es gibt verschiedene Modellvorstellungen über die Ursachen dieser Resistenzentwicklung. Da Zytostatika und Gamma-Strahlen einen Großteil ihrer Wirkung durch Induktion des Apoptoseprogramms (Anstoß des programmierten Zelltodes) ausüben, besteht eine Hypothese in der Vorstellung, daß in den resistenten Zellen das Apoptoseprogramm inhibiert oder herunterreguliert ist.

Die meisten Daten zu Mechanismen der Resistenzentwicklung wurden bislang in Zellkulturmodellen gewonnen. Auch diese Arbeit basiert auf einem solchen Modell. In unserer Arbeitsgruppe ist es gelungen, von den drei kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinien NCI-H69, NIH-N592 und NCI-H82, die normalerweise im Zellkulturmedium schwimmen, also im Suspensionszustand wachsen, Kulturen zu subkultivieren, die sich durch ein am Zellkulturflaschenboden adhärentes Wachstum auszeichneten. Diese adhärenen Zellen zeigten eine völlig veränderte Morphologie im Sinne von flachen, ausgezogenen, epitheloiden Zellen.

In der Arbeit wurde nun geprüft, ob die veränderte Morphologie der identischen Linien mit einer neu erworbenen Resistenz gegenüber verschiedenen Zytostatika (Etoposid, Cyclophosphamid, Doxorubicin und Taxol) einhergeht. Es fand sich eine deutliche Resistenz der adhärenen Subklone H69ad und N592ad gegenüber ihren Suspensions-Ausgangszelllinien H69sus und N592sus. Diese Resistenz der adhärenen H69ad und N592ad zeigte sich auch gegenüber der Bestrahlung mit Gamma-Strahlen.

Untersuchungen des Anteils der apoptotischen Zellen nach Gamma-Strahlen-Exposition ergaben in den adhärenen H69ad und N592ad eine deutlich geringere Zahl apoptotischer Zellen. Die gefundene Chemo-/Radioresistenz der adhärenen Zellen ist also am ehesten durch eine Inhibition des Apoptoseprogramms bedingt.

In den adhärenen Zelllinien H69ad und N592ad fanden sich auf RT-PCR-Ebene differentiell hochregulierte α 2-, α 3- und β 4-Integrine. Entsprechend anderen in der

Literatur beschriebenen Adhärenz-induzierten Chemo-/Radioresistenz-Modellen (CAM-DR), könnten diese Integrine die Mediatoren der Adhärenz-induzierten Resistenz in unserem Modell sein.

Interessanterweise fanden wir eine konstitutiv aktivierte Proteinkinase B/Akt in den adhären Klonen H69ad und N592ad, die in den Suspensionszelllinien H69sus und N592sus nicht vorlag. PKB/Akt ist eine Proteinkinase, die an zentraler Stelle eines potenten anti-apoptotischen Signaltransduktionsweges liegt. Die Aktivierung der PKB/Akt in H69ad und N592ad ist direkt Adhärenz-abhängig, da sie durch Rückführung des adhären Phänotyps der Linien H69ad und N592ad zu Suspensionszellen bei Kultivierung auf völlig unbeschichteten Kulturschalen rückgängig zu machen war.

Resultierend aus obigen Ergebnissen wurde in dieser Arbeit zusätzlich untersucht, ob über experimentelle Transfektion von PKB/Akt Antisense-Oligonukleotiden das Resistenzverhalten modullierbar ist. Die experimentellen Ergebnisse ließen hier jedoch keine eindeutige Schlussfolgerung zu.

Es verbleibt somit die Notwendigkeit, weitere Untersuchungen zum Mechanismus der Adhärenz-induzierten Chemo-/Radioresistenz durch Apoptoseinhibition durchzuführen. Auf der Basis eines besseren Verständnis könnten so in Zukunft eventuell neue Therapeutika entwickelt werden, die zu einer Überwindung dieses bisher ungelösten Therapieproblems beim kleinzelligen Bronchialkarzinom führen.

6. Literaturverzeichnis

Abeloff, M.D., Eggleston, J.C., Mendelsohn, G., Ettinger, D.S. & Baylin, S.B. (1979). Changes in morphologic and biochemical characteristics of small cell carcinoma of the lung. A clinicopathologic study. *Am J Med*, **66**, 757-64.

Abend, M. & van Beuningen, D. (1998). [Significance of apoptotic processes in radiotherapy. I]. *Strahlenther Onkol*, **174**, 156-66.

Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A. & Kemler, R. (1997). beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *Embo J*, **16**, 3797-804.

Adjei, A.A., Marks, R.S. & Bonner, J.A. (1999). Current guidelines for the management of small cell lung cancer. *Mayo Clin Proc*, **74**, 809-16.

Aisner, S.C., Finkelstein, D.M., Ettinger, D.S., Abeloff, M.D., Ruckdeschel, J.C. & Eggleston, J.C. (1990). The clinical significance of variant-morphology small-cell carcinoma of the lung. *J Clin Oncol*, **8**, 402-8.

Aoudjit, F. & Vuori, K. (2001). Integrin signaling inhibits paclitaxel-induced apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene*, **20**, 4995-5004.

Ashkenazi, A. & Dixit, V.M. (1999). Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol*, **11**, 255-60.

Bellacosa, A., Testa, J.R., Staal, S.P. & Tsichlis, P.N. (1991). A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science*, **254**, 274-7.

Berendsen, H.H., de Leij, L., de Vries, E.G., Mesander, G., Mulder, N.H., de Jong, B., Buys, C.H., Postmus, P.E., Poppema, S., Sluiter, H.J. & et al. (1988). Characterization of three small cell lung cancer cell lines established from one patient during longitudinal follow-up. *Cancer Res*, **48**, 6891-9.

Blume-Jensen, P. & Hunter, T. (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature*, **411**, 355-65.

Borges, M., Linnoila, R.I., van de Velde, H.J., Chen, H., Nelkin, B.D., Mabry, M., Baylin, S.B. & Ball, D.W. (1997). An achaete-scute homologue essential for neuroendocrine differentiation in the lung. *Nature*, **386**, 852-5.

Brambilla, E., Moro, D., Gazzeri, S., Brichon, P.Y., Nagy-Mignotte, H., Morel, F., Jacrot, M. & Brambilla, C. (1991). Cytotoxic chemotherapy induces cell differentiation in small-cell lung carcinoma. *J Clin Oncol*, **9**, 50-61.

Brodin, O., Arnberg, H., Bergh, J. & Nilsson, S. (1995). Increased radioresistance of an in vitro transformed human small cell lung cancer cell line. *Lung Cancer*, **12**, 183-98.

Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J. & Greenberg, M.E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*, **96**, 857-68.

Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X. & Wang, X. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **15**, 269-90.

Burgering, B.M. & Coffey, P.J. (1995). Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature*, **376**, 599-602.

Carbone, D.P., Koros, A.M., Linnoila, R.I., Jewett, P. & Gazdar, A.F. (1991). Neural cell adhesion molecule expression and messenger RNA splicing patterns in lung cancer cell lines are correlated with neuroendocrine phenotype and growth morphology. *Cancer Res*, **51**, 6142-9.

Carbone, D.P. (1997). The biology of lung cancer. *Semin Oncol*, **24**, 388-401.

Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E., Frisch, S. & Reed, J.C. (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*, **282**, 1318-21.

Carney, D.N., Mitchell, J.B. & Kinsella, T.J. (1983). In vitro radiation and chemotherapy sensitivity of established cell lines of human small cell lung cancer and its large cell morphological variants. *Cancer Res*, **43**, 2806-11.

Carney, D.N., Gazdar, A.F., Bepler, G., Guccion, J.G., Marangos, P.J., Moody, T.W., Zweig, M.H. & Minna, J.D. (1985). Establishment and identification of small cell lung cancer cell lines having classic and variant features. *Cancer Res*, **45**, 2913-23.

- Chen, H.C. & Guan, J.L. (1994). Association of focal adhesion kinase with its potential substrate phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 10148-52.
- Cheng, J.Q., Altomare, D.A., Klein, M.A., Lee, W.C., Kruh, G.D., Lissy, N.A. & Testa, J.R. (1997). Transforming activity and mitosis-related expression of the AKT2 oncogene: evidence suggesting a link between cell cycle regulation and oncogenesis. *Oncogene*, **14**, 2793-801.
- Coffer, P.J. & Woodgett, J.R. (1991). Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein- serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. *Eur J Biochem*, **201**, 475-81.
- Cross, T.G., Scheel-Toellner, D., Henriquez, N.V., Deacon, E., Salmon, M. & Lord, J.M. (2000). Serine/threonine protein kinases and apoptosis. *Exp Cell Res*, **256**, 34-41.
- Dalton, W.S. (1999). The tumor microenvironment as a determinant of drug response and resistance. *Drug Resist Updat*, **2**, 285-288.
- Damiano, J.S., Cress, A.E., Hazlehurst, L.A., Shtil, A.A. & Dalton, W.S. (1999). Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines. *Blood*, **93**, 1658-67.
- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y. & Greenberg, M.E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell- intrinsic death machinery. *Cell*, **91**, 231-41.
- Davis, R.J. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*, **103**, 239-52.
- de la Fuente, M.T., Casanova, B., Moyano, J.V., Garcia-Gila, M., Sanz, L., Garcia-Marco, J., Silva, A. & Garcia-Pardo, A. (2002). Engagement of alpha4beta1 integrin by fibronectin induces in vitro resistance of B chronic lymphocytic leukemia cells to fludarabine. *J Leukoc Biol*, **71**, 495-502.
- Dearing, M.P., Steinberg, S.M., Phelps, R., Anderson, M.J., Mulshine, J.L., Ihde, D.C. & Johnson, B.E. (1990). Outcome of patients with small-cell lung cancer: effect of changes in

staging procedures and imaging technology on prognostic factors over 14 years. *J Clin Oncol*, **8**, 1042-9.

Desagher, S., Osen-Sand, A., Nichols, A., Eskes, R., Montessuit, S., Lauper, S., Maundrell, K., Antonsson, B. & Martinou, J.C. (1999). Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol*, **144**, 891-901.

Desagher, S., Osen-Sand, A., Nichols, A., Eskes, R., Montessuit, S., Lauper, S., Maundrell, K., Antonsson, B. & Martinou, J.C. (1999). Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol*, **144**, 891-901.

Deveraux, Q.L. & Reed, J.C. (1999). IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev*, **13**, 239-52.

Dijkers, P.F., Medema, R.H., Lammers, J.W., Koenderman, L. & Coffey, P.J. (2000). Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr Biol*, **10**, 1201-4.

Dingemans, A.M., van Ark-Otte, J., van der Valk, P., Apolinario, R.M., Scheper, R.J., Postmus, P.E. & Giaccone, G. (1996). Expression of the human major vault protein LRP in human lung cancer samples and normal lung tissues. *Ann Oncol*, **7**, 625-30.

Du, K. & Montminy, M. (1998). CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *J Biol Chem*, **273**, 32377-9.

Dudek, H., Datta, S.R., Franke, T.F., Birnbaum, M.J., Yao, R., Cooper, G.M., Segal, R.A., Kaplan, D.R. & Greenberg, M.E. (1997). Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science*, **275**, 661-5.

Earnshaw, W.C., Martins, L.M. & Kaufmann, S.H. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem*, **68**, 383-424.

Ellis, R.E., Jacobson, D.M. & Horvitz, H.R. (1991). Genes required for the engulfment of cell corpses during programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, **129**, 79-94.

Franke, T.F., Yang, S.I., Chan, T.O., Datta, K., Kazlauskas, A., Morrison, D.K., Kaplan, D.R. & Tsichlis, P.N. (1995). The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell*, **81**, 727-36.

Fridman, R., Giaccone, G., Kanemoto, T., Martin, G.R., Gazdar, A.F. & Mulshine, J.L. (1990). Reconstituted basement membrane (matrigel) and laminin can enhance the tumorigenicity and the drug resistance of small cell lung cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 6698-702.

Friesen, C., Herr, I., Krammer, P.H. & Debatin, K.M. (1996). Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug- induced apoptosis in leukemia cells. *Nat Med*, **2**, 574-7.

Fulton, D., Gratton, J.P., McCabe, T.J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., Franke, T.F., Papapetropoulos, A. & Sessa, W.C. (1999). Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*, **399**, 597-601.

Fushimi, H., Kukui, M., Morino, H., Hosono, Y., Fukuoka, M., Kusunoki, Y., Aozasa, K. & Matsumoto, K. (1992). Detection of large cell component in small cell lung carcinoma by combined cytologic and histologic examinations and its clinical implication. *Cancer*, **70**, 599-605.

Fushimi, H., Kikui, M., Morino, H., Yamamoto, S., Tateishi, R., Wada, A., Aozasa, K. & Kotoh, K. (1996). Histologic changes in small cell lung carcinoma after treatment. *Cancer*, **77**, 278-83.

Gazdar, A.F., Carney, D.N., Russell, E.K., Sims, H.L., Baylin, S.B., Bunn, P.A., Jr., Guccion, J.G. & Minna, J.D. (1980). Establishment of continuous, clonable cultures of small-cell carcinoma of lung which have amine precursor uptake and decarboxylation cell properties. *Cancer Res*, **40**, 3502-7.

Gazdar, A.F., Carney, D.N., Nau, M.M. & Minna, J.D. (1985). Characterization of variant subclasses of cell lines derived from small cell lung cancer having distinctive biochemical, morphological, and growth properties. *Cancer Res*, **45**, 2924-30.

Gazdar, A.F., Helman, L.J., Israel, M.A., Russell, E.K., Linnoila, R.I., Mulshine, J.L., Schuller, H.M. & Park, J.G. (1988). Expression of neuroendocrine cell markers L-dopa

decarboxylase, chromogranin A, and dense core granules in human tumors of endocrine and nonendocrine origin. *Cancer Res*, **48**, 4078-82.

Goodwin, G. & Baylin, S.B. (1982). Relationships between neuroendocrine differentiation and sensitivity to gamma-radiation in culture line OH-1 of human small cell lung carcinoma. *Cancer Res*, **42**, 1361-7.

Greenlee, R.T., Hill-Harmon, M.B., Murray, T. & Thun, M. (2001). Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin*, **51**, 15-36.

Griffiths, G.J., Dubrez, L., Morgan, C.P., Jones, N.A., Whitehouse, J., Corfe, B.M., Dive, C. & Hickman, J.A. (1999). Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *J Cell Biol*, **144**, 903-14.

Grindey, G.B. (1990). Current status of cancer drug development: failure or limited success? *Cancer Cells*, **2**, 163-71.

Gross, A., McDonnell, J.M. & Korsmeyer, S.J. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, **13**, 1899-911.

Grossi, F., Scolaro, T., Tixi, L., Loprevite, M. & Ardizzoni, A. (2001). The role of systemic chemotherapy in the treatment of brain metastases from small-cell lung cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, **37**, 61-7.

Hakem, R., Hakem, A., Duncan, G.S., Henderson, J.T., Woo, M., Soengas, M.S., Elia, A., de la Pompa, J.L., Kagi, D., Khoo, W., Potter, J., Yoshida, R., Kaufman, S.A., Lowe, S.W., Penninger, J.M. & Mak, T.W. (1998). Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell*, **94**, 339-52.

Hendry, J.H. & West, C.M. (1997). Apoptosis and mitotic cell death: their relative contributions to normal-tissue and tumour radiation response. *Int J Radiat Biol*, **71**, 709-19.

Hirsch, F.R., Osterlind, K. & Hansen, H.H. (1983). The prognostic significance of histopathologic subtyping of small cell carcinoma of the lung according to the classification of the World Health Organization. A study of 375 consecutive patients. *Cancer*, **52**, 2144-50.

Holcik, M., Yeh, C., Korneluk, R.G. & Chow, T. (2000). Translational upregulation of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) increases resistance to radiation induced cell death. *Oncogene*, **19**, 4174-7.

Houghton, J.A. (1999). Apoptosis and drug response. *Curr Opin Oncol*, **11**, 475-81.

Jones, P.F., Jakubowicz, T., Pitossi, F.J., Maurer, F. & Hemmings, B.A. (1991). Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 4171-5.

Kandel, E.S. & Hay, N. (1999). The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp Cell Res*, **253**, 210-29.

Kang, S.S., Kwon, T., Kwon, D.Y. & Do, S.I. (1999). Akt protein kinase enhances human telomerase activity through phosphorylation of telomerase reverse transcriptase subunit. *J Biol Chem*, **274**, 13085-90.

Kasimis, B.S., Wuerker, R.B., Hunt, J.D., Kaneshiro, C.A. & Williams, J.L. (1986). Relationship between changes in the histologic subtype of small cell carcinoma of the lung and the response to chemotherapy. *Am J Clin Oncol*, **9**, 318-24.

Kaufmann, S.H. & Earnshaw, W.C. (2000). Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res*, **256**, 42-9.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H. & Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, **26**, 239-57.

Khwaja, A., Rodriguez-Viciano, P., Wennstrom, S., Warne, P.H. & Downward, J. (1997). Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway. *Embo J*, **16**, 2783-93.

Kim, A.H., Khursigara, G., Sun, X., Franke, T.F. & Chao, M.V. (2001). Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol Cell Biol*, **21**, 893-901.

King, W.G., Mattaliano, M.D., Chan, T.O., Tsichlis, P.N. & Brugge, J.S. (1997). Phosphatidylinositol 3-kinase is required for integrin-stimulated AKT and Raf-1/mitogen-activated protein kinase pathway activation. *Mol Cell Biol*, **17**, 4406-18.

- Klippel, A., Kavanaugh, W.M., Pot, D. & Williams, L.T. (1997). A specific product of phosphatidylinositol 3-kinase directly activates the protein kinase Akt through its pleckstrin homology domain. *Mol Cell Biol*, **17**, 338-44.
- Kops, G.J., de Ruiter, N.D., De Vries-Smits, A.M., Powell, D.R., Bos, J.L. & Burgering, B.M. (1999). Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature*, **398**, 630-4.
- Li, X., Gong, J., Feldman, E., Seiter, K., Traganos, F. & Darzynkiewicz, Z. (1994). Apoptotic cell death during treatment of leukemias. *Leuk Lymphoma*, **13**, 65-70.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S. & Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, **91**, 479-89.
- Little, C.D., Nau, M.M., Carney, D.N., Gazdar, A.F. & Minna, J.D. (1983). Amplification and expression of the c-myc oncogene in human lung cancer cell lines. *Nature*, **306**, 194-6.
- Liu, Q., Sasaki, T., Kozieradzki, I., Wakeham, A., Itie, A., Dumont, D.J. & Penninger, J.M. (1999). SHIP is a negative regulator of growth factor receptor-mediated PKB/Akt activation and myeloid cell survival. *Genes Dev*, **13**, 786-91.
- Mayo, L.D. & Donner, D.B. (2001). A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 11598-603.
- Medema, R.H., Kops, G.J., Bos, J.L. & Burgering, B.M. (2000). AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature*, **404**, 782-7.
- Mesner, P.W., Jr., Budihardjo, II & Kaufmann, S.H. (1997). Chemotherapy-induced apoptosis. *Adv Pharmacol*, **41**, 461-99.
- Minna. (2002). Neoplasms of the Lung. In *Harrison's Principles of Internal Medicine* pp. 562-571.

- Miyashita, T. & Reed, J.C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*, **80**, 293-9.
- Morstyn, G., Russo, A., Carney, D.N., Karawya, E., Wilson, S.H. & Mitchell, J.B. (1984). Heterogeneity in the radiation survival curves and biochemical properties of human lung cancer cell lines. *J Natl Cancer Inst*, **73**, 801-7.
- Muise-Helmericks, R.C., Grimes, H.L., Bellacosa, A., Malstrom, S.E., Tsichlis, P.N. & Rosen, N. (1998). Cyclin D expression is controlled post-transcriptionally via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *J Biol Chem*, **273**, 29864-72.
- Nakashio, A., Fujita, N., Rokudai, S., Sato, S. & Tsuruo, T. (2000). Prevention of phosphatidylinositol 3'-kinase-Akt survival signaling pathway during topotecan-induced apoptosis. *Cancer Res*, **60**, 5303-9.
- Nicholson, K.M. & Anderson, N.G. (2002). The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal*, **14**, 381-95.
- O'Gorman, D.M., McKenna, S.L., McGahon, A.J., Knox, K.A. & Cotter, T.G. (2000). Sensitisation of HL60 human leukaemic cells to cytotoxic drug-induced apoptosis by inhibition of PI3-kinase survival signals. *Leukemia*, **14**, 602-11.
- Oka, M., Fukuda, M., Sakamoto, A., Takatani, H., Soda, H. & Kohno, S. (1997). The clinical role of MDR1 gene expression in human lung cancer. *Anticancer Res*, **17**, 721-4.
- Ozes, O.N., Mayo, L.D., Gustin, J.A., Pfeffer, S.R., Pfeffer, L.M. & Donner, D.B. (1999). NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine- threonine kinase. *Nature*, **401**, 82-5.
- Paesmans, M., Sculier, J.P., Lecomte, J., Thiriaux, J., Libert, P., Sergysels, R., Bureau, G., Dabouis, G., Van Cutsem, O., Mommen, P., Ninane, V. & Klastersky, J. (2000). Prognostic factors for patients with small cell lung carcinoma: analysis of a series of 763 patients included in 4 consecutive prospective trials with a minimum follow-up of 5 years. *Cancer*, **89**, 523-33.

- Page, C., Lin, H.J., Jin, Y., Castle, V.P., Nunez, G., Huang, M. & Lin, J. (2000). Overexpression of Akt/AKT can modulate chemotherapy-induced apoptosis. *Anticancer Res*, **20**, 407-16.
- Pearse, A.G. (1969). The cytochemistry and ultrastructure of polypeptide hormone-producing cells of the APUD series and the embryologic, physiologic and pathologic implications of the concept. *J Histochem Cytochem*, **17**, 303-13.
- Pugazhenth, S., Nesterova, A., Sable, C., Heidenreich, K.A., Boxer, L.M., Heasley, L.E. & Reusch, J.E. (2000). Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein. *J Biol Chem*, **275**, 10761-6.
- Radice, P.A., Matthews, M.J., Ihde, D.C., Gazdar, A.F., Carney, D.N., Bunn, P.A., Cohen, M.H., Fossieck, B.E., Makuch, R.W. & Minna, J.D. (1982). The clinical behavior of "mixed" small cell/large cell bronchogenic carcinoma compared to "pure" small cell subtypes. *Cancer*, **50**, 2894-902.
- Roepe, P.D. (2000). What is the precise role of human MDR 1 protein in chemotherapeutic drug resistance? *Curr Pharm Des*, **6**, 241-60.
- Romashkova, J.A. & Makarov, S.S. (1999). NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature*, **401**, 86-90.
- Salge, U., Seitz, R., Wimmel, A., Schuermann, M., Daubner, E. & Heiden, M. (2001). Transition from suspension to adherent growth is accompanied by tissue factor expression and matrix metalloproteinase secretion in a small cell lung cancer cell line. *J Cancer Res Clin Oncol*, **127**, 139-41.
- Sehested, M., Hirsch, F.R., Osterlind, K. & Olsen, J.E. (1986). Morphologic variations of small cell lung cancer. A histopathologic study of pretreatment and posttreatment specimens in 104 patients. *Cancer*, **57**, 804-7.
- Seifter, E.J. & Ihde, D.C. (1988). Therapy of small cell lung cancer: a perspective on two decades of clinical research. *Semin Oncol*, **15**, 278-99.

Sethi, T. & Rozengurt, E. (1991). Multiple neuropeptides stimulate clonal growth of small cell lung cancer: effects of bradykinin, vasopressin, cholecystokinin, galanin, and neurotensin. *Cancer Res*, **51**, 3621-3.

Sethi, T., Rintoul, R.C., Moore, S.M., MacKinnon, A.C., Salter, D., Choo, C., Chilvers, E.R., Dransfield, I., Donnelly, S.C., Strieter, R. & Haslett, C. (1999). Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: a mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo. *Nat Med*, **5**, 662-8.

Shimizu, S., Narita, M. & Tsujimoto, Y. (1999). Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature*, **399**, 483-7.

Shtivelman, E. & Namikawa, R. (1995). Species-specific metastasis of human tumor cells in the severe combined immunodeficiency mouse engrafted with human tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 4661-5.

Shtivelman, E. (1997). A link between metastasis and resistance to apoptosis of variant small cell lung carcinoma. *Oncogene*, **14**, 2167-73.

Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D'Amico, M., Pestell, R. & Ben-Ze'ev, A. (1999). The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 5522-7.

Siegel, R.M., Martin, D.A., Zheng, L., Ng, S.Y., Bertin, J., Cohen, J. & Lenardo, M.J. (1998). Death-effector filaments: novel cytoplasmic structures that recruit caspases and trigger apoptosis. *J Cell Biol*, **141**, 1243-53.

Sirzen, F., Zhivotovsky, B., Nilsson, A., Bergh, J. & Lewensohn, R. (1998). Higher spontaneous apoptotic index in small cell compared with non- small cell lung carcinoma cell lines; lack of correlation with Bcl- 2/Bax. *Lung Cancer*, **22**, 1-13.

Stambolic, V., Suzuki, A., de la Pompa, J.L., Brothers, G.M., Mirtsos, C., Sasaki, T., Ruland, J., Penninger, J.M., Siderovski, D.P. & Mak, T.W. (1998). Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell*, **95**, 29-39.

Stehlik, C., de Martin, R., Kumabashiri, I., Schmid, J.A., Binder, B.R. & Lipp, J. (1998). Nuclear factor (NF)-kappaB-regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects

endothelial cells from tumor necrosis factor alpha- induced apoptosis. *J Exp Med*, **188**, 211-6.

Taylor, S.T., Hickman, J.A. & Dive, C. (1999). Survival signals within the tumour microenvironment suppress drug- induced apoptosis: lessons learned from B lymphomas. *Endocr Relat Cancer*, **6**, 21-3.

Travis, W.D., Lubin, J., Ries, L. & Devesa, S. (1996). United States lung carcinoma incidence trends: declining for most histologic types among males, increasing among females. *Cancer*, **77**, 2464-70.

Travis, W.D., Colby, T.V. & Corrin, B. (1999). *The World Health Organization histological typing of lung and pleural tumors*.

Uhm, J.H., Dooley, N.P., Kyritsis, A.P., Rao, J.S. & Gladson, C.L. (1999). Vitronectin, a glioma-derived extracellular matrix protein, protects tumor cells from apoptotic death. *Clin Cancer Res*, **5**, 1587-94.

Vanhaesebroeck, B. & Waterfield, M.D. (1999). Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp Cell Res*, **253**, 239-54.

Vanhaesebroeck, B. & Alessi, D.R. (2000). The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J*, **346 Pt 3**, 561-76.

Volm, M., Mattern, J. & Koomagi, R. (1997). Expression of lung resistance-related protein (LRP) in non-small cell lung carcinomas of smokers and non-smokers and its predictive value for doxorubicin resistance. *Anticancer Drugs*, **8**, 931-6.

Wagener, C. (1999). *Molekulare Onkologie. Entstehung und Progression maligner Tumoren*. Thieme-Verlag.

Wang, C.Y., Mayo, M.W., Korneluk, R.G., Goeddel, D.V. & Baldwin, A.S., Jr. (1998). NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science*, **281**, 1680-3.

Wang, J.M., Chao, J.R., Chen, W., Kuo, M.L., Yen, J.J. & Yang-Yen, H.F. (1999). The antiapoptotic gene mcl-1 is up-regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling

pathway through a transcription factor complex containing CREB. *Mol Cell Biol*, **19**, 6195-206.

Wang, C.Y., Cusack, J.C., Jr., Liu, R. & Baldwin, A.S., Jr. (1999). Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF-kappaB. *Nat Med*, **5**, 412-7.

WHO. (1982). The World Health Organization histological typing of lung tumours. Second edition. *Am J Clin Pathol*, **77**, 123-36.

Wingo, P.A., Ries, L.A., Giovino, G.A., Miller, D.S., Rosenberg, H.M., Shopland, D.R., Thun, M.J. & Edwards, B.K. (1999). Annual report to the nation on the status of cancer, 1973-1996, with a special section on lung cancer and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst*, **91**, 675-90.

Wu, M.X., Ao, Z., Prasad, K.V., Wu, R. & Schlossman, S.F. (1998). IEX-1L, an apoptosis inhibitor involved in NF-kappaB-mediated cell survival. *Science*, **281**, 998-1001.

Wyllie, A.H., Kerr, J.F. & Currie, A.R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*, **68**, 251-306.

Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L.H., Thompson, C.B. & Korsmeyer, S.J. (1995). Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell*, **80**, 285-91.

Yeh, W.C., Pompa, J.L., McCurrach, M.E., Shu, H.B., Elia, A.J., Shahinian, A., Ng, M., Wakeham, A., Khoo, W., Mitchell, K., El-Deiry, W.S., Lowe, S.W., Goeddel, D.V. & Mak, T.W. (1998). FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science*, **279**, 1954-8.

Zhivotovsky, B., Joseph, B. & Orrenius, S. (1999). Tumor radiosensitivity and apoptosis. *Exp Cell Res*, **248**, 10-7.

Zhou, H., Li, X.M., Meinkoth, J. & Pittman, R.N. (2000). Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level. *J Cell Biol*, **151**, 483-94.

Zhou, B.P., Liao, Y., Xia, W., Spohn, B., Lee, M.H. & Hung, M.C. (2001). Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol*, **3**, 245-52. [taf/DynaPage.taf?file=/ncb/journal/v3/n3/full/ncb0301_245.html](#) [taf/DynaPage.taf?file=/ncb/journal/v3/n3/abs/ncb0301_245.html](#).

7. Abkürzungen

| | |
|-------------|-----------------------------------------------|
| CAM-DR | <i>cell adhesion mediated-drug resistance</i> |
| C3E | Caspase-3-Einheit |
| CDK4 | <i>cyclin dependent kinase 4</i> |
| DR | <i>death receptor</i> |
| EZM | extrazelluläre Matrix |
| FACS | <i>fluorescence activated cell scanning</i> |
| FADD | <i>Fas associated death domain</i> |
| hASH | <i>human achaete-scute-homologue</i> |
| GRP | <i>gastrin releasing peptide</i> |
| IAP | <i>inhibitor of apoptosis protein</i> |
| LRP | <i>lung resistance protein</i> |
| MAPK | <i>mitogen activated protein kinase</i> |
| MDR | <i>multi drug resistance</i> |
| NSCLC | <i>non small cell lung carcinoma</i> |
| PH-D | Pleckstrin-Homologie-Bindungs-Domäne |
| PI | Propidiumiodid |
| PI3-K | Phosphatidylinositol-3-Kinase |
| PI(4,5)P2 | Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat |
| PI(3,4,5)P3 | Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat |
| PKB/Akt | Proteinkinase B |

| | |
|--------|-------------------------------------------|
| rpm | <i>rounds per minute</i> |
| RTK | Rezeptortyrosinkinase |
| SCLC | <i>small cell lung carcinoma</i> |
| c-SCLC | klassisches SCLC |
| v-SCLC | variantes SCLC |
| VEGF | <i>vascular endothelial growth factor</i> |
| TNF | Tumor-Nekrose-Faktor |
| z. B. | zum Beispiel |

8. Anhang

8.1. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:

Arnold, Aumüller, Basler, Dauth, Engenhart-Cabillic, Feuser, Geus, Gotzen, Gressner, Griss, Happle, Kern, Klenk, Klose, Koolmann, Kretschmer, Lang, Leppek, Maisch, Moll, Moosdorf, Müller, Neubauer, Oertel, Remschmidt, Rothmund, Röhm, Seitz, Schüffel, Steiniger, Voigt, Weihe, Werner, Wichert, Wulf.

8.2. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Bachmann
 Vorname: Sven-Oliver
 Adresse: Enderleinstraße 11, 90478 Nürnberg
 Geboren: 16.10.1973 in Pinneberg/Holstein
 Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulbildung:

08/1980-06/1984 Grundschule Stierstadt
 08/1984-06/1993 Bischof-Neumann-Schule Königstein

Zivildienst:

01/1994-03/1995 Arbeiter-Samariter-Bund, Eschborn

Hochschulbildung:

04/1995-06/2002 Studium der Humanmedizin an der
 Philipps-Universität Marburg
 04/1997 Ärztliche Vorprüfung
 04/1998 1. Staatsexamen
 04/2001 2. Staatsexamen
 04/2001-03/2002 Praktisches Jahr
 06/2002 3. Staatsexamen

Promotion

12/1998-08/2000 Anfertigung der Promotionsarbeit in der Arbeitsgruppe
 von Prof. Dr. Marcus Schuermann
 07/2002-11/2002 Abteilung für Hämatologie/Onkologie, Zentrum für Innere
 Medizin der Philipps-Universität Marburg.

Arzt im Praktikum (AiP)

02/2003-08/2003 Pre Registration House Officer im Leighton Hospital Crewe,
 England, General Medicine (Innere Medizin)
 Leiter: Dr. H.W. Jones
 09/2003-08/2004 Medizinische Klinik II (Kardiologie) der Universitätsklinik
 Erlangen, Leiter Prof. Dr. W.G. Daniel
 09/2004 Approbation
 09/2004-andauernd Medizinische Klinik II (Kardiologie) der Universitätsklinik
 Erlangen, Leiter Prof. Dr. W.G. Daniel

8.3. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

Chemo- und Radioresistenzverhalten kleinzelliger Bronchialkarzinomzelllinien in Adhärenz- und Suspensionskultur

im Zentrum für Innere Medizin in der Abteilung für Hämatologie, Onkologie und Immunologie unter der Leitung von Prof. Dr. A. Neubauer mit Unterstützung durch Prof. Dr. M. Schuermann ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden folgendermaßen veröffentlicht:

Kraus AC, Ferber I, Bachmann SO, Specht H, Wimmel A, Gross MW, Schlegel J, Suske G, Schuermann M.

In vitro chemo- and radio-resistance in small cell lung cancer correlates with cell adhesion and constitutive activation of AKT and MAP kinase pathways.

Oncogene. 2002 Dec 12;21(57):8683-95.

Nürnberg, 03.11.2004

8.4. Danksagung

Mein Dank gilt

Herrn Prof. Marcus Schuermann für die Aufnahme in eine gut funktionierende Arbeitsgruppe, die Bereitstellung des Themas und die exzellente Betreuung

Frau Dr. Alison Kraus in ganz besonderem Maße für die exzellente fachliche und menschliche Betreuung des Projekts

Herrn Dr. Marcus Gross für die Durchführung der Bestrahlung der Zelllinien

Frau Dr. Emily Slater für die Überlassung der PKB/Akt-Antisense-Oigonukleotide

den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Schuermann für die sehr gute Arbeitsatmosphäre, die so manchen Labortag versüßt hat

den Herren Dr. Michael Kersting und Dr. Andreas Burchert für fruchtbare Diskussionen und tatkräftige Hilfe

meinen Eltern und meiner Schwester für die andauernde und verlässliche Unterstützung